

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Evaluación de la calidad espermática y ensayos  
preliminares en Criopreservación de espermatozoides  
de Lenguado *Paralichthys Adspersus* (Steindachner,  
1867)**

**TESIS**

**Para optar al Título Profesional de  
Bióloga Genetista Biotecnóloga**

**AUTOR**

**Melissa Montes Montes**

**ASESORES**

**Mg. Martha Esther Valdivia Cuya**

**Ing. Lili Jannet Carrera Santos**

**Lima – Perú**

**2012**

*Gracias a Dios y a la Virgen María  
por darme la fuerza necesaria para seguir adelante.*

*Gracias también a todas las personas que me  
apoyaron en este camino, en especial:*

*A mis padres Willy y Elsa,*

*A mi hermana Lesly,*

*A mis abuelos Domingo e Irma, y Luis y Dila,*

*A mis tíos Alejandro, Nichi y Marina*

*Y a mi amor Tato,*

*Ustedes son mi soporte y balance*

*¡GRACIAS!*

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis Magister Martha Valdivia Cuya de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el apoyo brindado y los consejos que me llevaron a culminar con mi trabajo.

A mi co-asesora de tesis la Ingeniera Lili Jannet Carrera Santos de la Unidad de Investigaciones en Acuicultura del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), por sus enseñanzas sobre reproducción de peces, por el apoyo incondicional en la realización de este trabajo de tesis y sobre todo por la confianza depositada.

Al Proyecto FINCyT: “Producción de semilla del lenguado *Paralichthys adspersus* en cautiverio: I Mejoramiento de la calidad y cantidad de desoves” y a sus integrantes Magister Carlos Espinoza, Ingeniero Christian Catcoparco, Técnico Cristian Santos y Blga. Noemi Cota por sus enseñanzas, ayuda, tiempo y paciencia durante la realización de la tesis.

Al IMARPE por permitirme desarrollar la tesis dentro de sus instalaciones y brindarme todo el material necesario para llevarla a cabo. A sus diferentes laboratorios: Laboratorio de Cultivo de Peces, Laboratorio de Biología Reproductiva, Laboratorio de Biotecnología Acuática, Laboratorio de Geología Marina y Laboratorio de Cultivos Marinos por las facilidades brindadas. A mis amigos y colegas especialistas quienes fueron de gran apoyo durante este periodo.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a todos los profesores que me brindaron una enseñanza sólida, en especial a los revisores de esta tesis, quienes atendieron mis dudas y me apoyaron con sus correcciones, sugerencias y comentarios.

## INDICE GENERAL

### LISTA DE FIGURAS

### RESUMEN

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCION</b>	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	
2.1. GENERALIDADES	5
2.1.1. TAXONOMÍA	
2.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE	
2.2. ANTECEDENTES	6
2.3. BASES TEÓRICAS	
2.3.1. CALIDAD ESPERMÁTICA	8
2.3.1.1. Parámetros básicos de calidad espermática	
2.3.2. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES	13
2.3.2.1. Diluyentes	
2.3.2.2. Crioprotectores	
2.3.2.3. Tasa de congelamiento	
2.3.2.4. Tasa de descongelamiento	
<b>3. OBJETIVOS</b>	17
3.1. OBJETIVO GENERAL	
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

4.1. MATERIALES .....	18
4.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO	
4.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO	
4.1.3. EQUIPOS	
4.1.4. REACTIVOS QUÍMICOS	
4.2. MÉTODOS	
4.2.1. OBTENCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES .....	19
4.2.2. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA DE SEMEN .....	21
4.2.3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA .....	23
4.2.3.1. Evaluación del volumen espermática	
4.2.3.2. Evaluación de la concentración espermática	
4.2.3.3. Evaluación de la motilidad espermática	
4.2.3.4. Evaluación de la viabilidad espermática	
a) <i>Viabilidad espermática por Tinción Eosina –Nigrosina</i>	
b) <i>Viabilidad espermática por Tinción Live/Dead® Sperm Viability Kit</i>	
4.2.4. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES .....	30
4.2.4.1. Evaluación de la toxicidad de crioprotectores	
4.2.4.2. Evaluación de tasas de congelamiento con el crioprotector óptimo	
4.2.4.3. Evaluación de tasas de descongelamiento	
4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	34

## **5. RESULTADOS**

5.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA .....	35
5.1.1. Evaluación del volumen espermática	
5.1.2. Evaluación de la concentración espermática	
5.1.3. Evaluación de la motilidad espermática	

5.1.4. Evaluación de la viabilidad espermática	
5.2. DETERMINACIÓN DEL CRIOPROTECTOR Y SU CONCENTRACIÓN ÓPTIMA	
.....	40
5.3. DETERMINAR LA TASA DE CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO	
5.3.1. Evaluar la condición espermática post-congelamiento a través de la	
motilidad espermática .....	44
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	45
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	57
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	58
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59
<b>10. ANEXO</b> .....	71

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Resultados de viabilidad espermática mediante dos técnicas de tinción.

Figura 1. Producción mundial acuícola: crecimiento anual por región desde 1970.

Figura 2. Zonas de colecta (puntos rojos).

Figura 3. Laboratorio de Cultivo de Peces (IMARPE).

Figura 4. Extracción de la muestra de semen.

Figura 5. Evaluación de la concentración y motilidad espermática.

Figura 6. Viabilidad espermática por Técnica Eosina-Nigrosina.

Figura 7. Tinción Eosina-Nigrosina, espermatozoides viables (V) y no viables (NV).

Figura 8. Viabilidad espermática por Kit LIVE/DEAD®.

Figura 9. Tinción Kit LIVE/DEAD®, espermatozoides viables (V) y no viables (NV).

Figura 10. Criopreservación de espermatozoides.

Figura 11. Correlación del volumen espermático y el peso total del individuo.

Figura 12. Diagrama de cajas de la concentración espermática (n=11).

Figura 13. Evaluación de la motilidad espermática (n=11).

Figura 14. Correlación de la motilidad espermática y el tiempo post-activación en AMFE.

Figura 15. Diagrama de cajas de viabilidad espermática. Eo-Nig: Tinción Eosina-Nigrosina y SYBR-IP: Kit de Viabilidad Espermática LIVE/DEAD.

Figura 16. Motilidad espermática post-incubación en crioprotectores a concentración 1 M.

Figura 17. Motilidad espermática post-incubación en crioprotectores a concentración 1.5 M.

Figura 18. Motilidad espermática post-incubación en crioprotectores a concentración 2 M.

Figura 19. Evaluación de tasas de congelamiento y descongelamiento.

## RESUMEN

La acuicultura de peces planos se ha incrementado notablemente en los últimos años, sin embargo existen disfunciones reproductivas que no permiten una reproducción exitosa en cautiverio, por lo tanto, conocer el estado reproductivo de los ejemplares así como la calidad de sus gametos es de vital importancia. La evaluación de la calidad espermática permite incrementar no solo los índices de supervivencia larval sino la aplicación de técnicas como la fecundación *in vitro*, el monitoreo de las condiciones de cultivo y la criopreservación con el fin de asegurar la reproducción en cautiverio.

Los resultados obtenidos en relación a los parámetros de calidad espermática del lenguado *Paralichthys adspersus* acondicionado al cautiverio fueron el volumen espermático con  $758 \pm 310 \mu\text{L}$ , la concentración espermática fue de  $2.49 \pm 0.26 \times 10^{10}$  espermatozoides/mL, la clase de motilidad fue  $4.00 \pm 0.26$  con un porcentaje el 50 y 90 % y la viabilidad espermática se evaluó mediante dos técnicas de tinción, se obtuvo  $98.31 \pm 0.26 \%$  con Eosina-Nigrosina y  $87.67 \pm 8.28 \%$  con el Kit LIVE/DEAD®. Además, se realizaron ensayos preliminares en criopreservación de espermatozoides, donde se evaluó la motilidad espermática post-incubación en soluciones crioprotectoras, obteniéndose los mejores resultados con DMSO a una concentración de 1.5 M cuya clase de motilidad fue  $3.04 \pm 0.23$  con un  $51.79 \pm 5.83 \%$ . Por otro lado, la motilidad espermática luego de la criopreservación fue  $12.09 \pm 2.27 \%$ , con una tasa de congelamiento de  $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y de descongelamiento de  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

La presente tesis se presenta como el primer reporte de la calidad espermática de *Paralichthys adspersus* en cautiverio, así como los primeros ensayos para la criopreservación de espermatozoides en esta especie.

**PALABRAS CLAVE:** *Paralichthys adspersus*, espermatozoides, calidad espermática y criopreservación.



## ABSTRACT

Flatfish aquaculture has increased markedly in recent years; however there are reproductive dysfunctions that prevent successful reproduction in captivity, therefore, to know the reproductive status of individuals and the quality of their gametes is of great importance. The evaluation of sperm quality can increase not only the larval survival rates but the application of techniques such as artificial insemination, monitoring culture conditions and cryopreservation in order to ensure the reproduction in captivity.

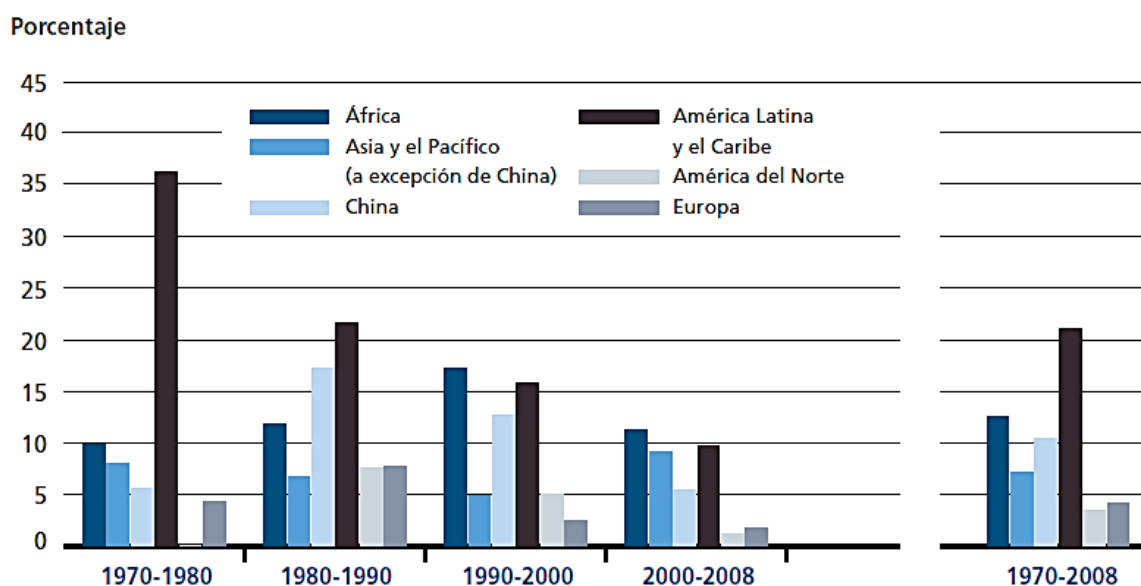
The results obtained in relation to semen quality parameters of flounder *Paralichthys adspersus* conditioned to captivity were sperm volume with  $758 \pm 310 \mu\text{l}$ , sperm concentration was  $2.49 \pm 0.26 \times 10^{10}$  cells/mL, the class of motility was  $4.00 \pm 0.26$  indicating a range 50 to 90 % and spermatozoa viability was determined using two different staining techniques, with Eosin - Nigrosine technique was obtained  $98.31 \pm 0.26$  % and with the kit LIVE/DEAD ® was obtained  $87.67 \pm 8.28$  %. In addition, preliminary assays on cryopreservation of spermatozoa were carried out, sperm motility was assessed post-incubation in cryoprotectant solutions, obtaining the best results with DMSO at a concentration of 1.5 M, the class of motility was  $3.04 \pm 0.23$  and the percentage of sperm motility was  $51.79 \pm 5.83$  %. On the other hand, sperm motility after thawing was  $12.09 \pm 2.27$  %, with a cooling rate  $-15^\circ \text{C/min}$  and thawing rate  $50^\circ \text{C/min}$ .

This thesis is presented as the first study of sperm quality for *P. adspersus* in captivity, and the first assays for the cryopreservation of sperm in this species.

**KEY WORDS:** *Paralichthys adspersus*, spermatozoa, sperm quality and criopreservation.

## 1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es la producción controlada de especies acuáticas para consumo humano y uso industrial (FAO, 2006). Actualmente, la acuicultura se encuentra liderada en gran medida por la región de Asia y el Pacífico debido principalmente a la producción de China. Sin embargo, la región de América Latina y el Caribe presenta el mayor crecimiento medio anual en el período 1970 - 2008 (21,1 %), seguida por el Cercano Oriente (14,1 %) y África (12,6 %) (Figura 1) (FAO, 2010).



Nota: No se contabilizan las plantas acuáticas.

Figura 1. Producción mundial acuícola: crecimiento anual por región desde 1970.

La acuicultura se diversifica con el cultivo de nuevas especies de alto valor comercial (Rideout *et al.*, 2003). La producción acuícola se encuentra liderada por la producción en agua dulce que representa el 59.9 % de la producción acuícola mundial mientras que la acuicultura en agua de mar genera el 32.3 % (FAO, 2010).

En relación a la producción acuícola de peces planos, ésta aumentó notablemente desde las 26 300 toneladas en el 2000 hasta las 148 800 toneladas en el 2008, siendo China y España los principales productores (FAO, 2010), tal crecimiento se debió a que las especies pleuronectiformes poseen altos precios en el mercado europeo (Howell, 1997 y Brown, 2002).

Los cultivos experimentales y comerciales en peces planos se han desarrollado en especies como *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson *et al.*, 1999), *Solea solea* (Howell, 1997), *Scophthalmus maximus* (Alvial y Manríquez, 1999), *Hippoglossus hippoglossus* (Olsen *et al.*, 1999) y *Solea senegalensis* (Anguis y Cañavate, 2005). Dentro del género de *Paralichthys* se menciona a *P. microps* (Silva, 2001), *P. olivaceus* (Yamaguchi *et al.*, 2007), *P. californicus* (Palumbo *et al.*, 2007), *P. adspersus* (Silva y Oliva, 2010) y *P. orbignyanus* (Lanes *et al.*, 2010).

Sin embargo, la mayoría de las especies cultivadas muestran algunas disfunciones reproductivas causadas por el estrés asociado al cautiverio o la inapropiada regulación del ambiente (Mañanós *et al.*, 2008). Las disfunciones reproductivas observadas en los cultivos de peces dependen de la especie y varían desde la ausencia total de desove hasta la reducción significativa en la cantidad y calidad de los gametos que se producen. En el cultivo de peces planos los problemas críticos en el aspecto reproductivo se dan durante la maduración final de los ovocitos, la ovulación y el desove por el lado de las hembras; mientras que en los machos se tienen deficiencias en la producción de semen, disminuyendo su volumen o calidad (Zohar y Mylonas, 2001) lo cual se traduce finalmente en baja calidad de huevos y larvas.

Generalmente, las investigaciones en acuicultura se han centrado en la calidad de huevos y larvas pero no en la calidad de espermatozoides, siendo este último un factor que

también afecta el éxito de la fecundación hasta la calidad de las larvas (Rurangwa *et al.*, 2004). Así, el estado reproductivo masculino es tan importante como el femenino y el desarrollo de técnicas para la evaluación de la calidad del esperma adquiere mayor relevancia.

Para evaluar la calidad espermática, se puede utilizar cualquier parámetro cuantificable que se correlacione directamente con la capacidad de fecundación del esperma (Beirão *et al.*, 2009). Entre ellos se pueden mencionar: composición del líquido seminal, volumen de semen, densidad de esperma, motilidad, pH, osmolaridad, viabilidad, morfología y ultraestructura del espermatozoide (Rurangwa *et al.*, 2004 y Cabrita *et al.*, 2008). Por lo tanto, la calidad no se basa en una característica particular del semen, por lo que no se puede considerar un parámetro predictivo único. La evaluación conjunta de dichos parámetros puede proporcionarnos una idea coherente de la calidad de la muestra de semen con el fin de predecir su capacidad fecundante.

Así mismo, una buena calidad espermática no solo permite incrementar los índices de supervivencia larval (Alavi *et al.*, 2007) sino la aplicación de técnicas como la fecundación *in vitro*, el monitoreo de las condiciones de cultivo o determinadas biotecnologías como la criopreservación que aseguran la reproducción en cautiverio.

La criopreservación de espermatozoides, es una biotecnología que ha resultado exitosa en muchas especies de peces, debido a que sincroniza la disponibilidad de gametos, permite el uso del volumen total de semen disponible, reduce los costos relacionados con el mantenimiento de reproductores machos, facilita el transporte de gametos, evita el envejecimiento de los espermatozoides, permite la conservación de la variabilidad genética (Suquet *et al.*, 2000) y almacenar los espermatozoides durante periodos prolongados para su posterior uso mediante inseminación artificial (Medina *et al.*, 2005).

El proceso de criopreservación de semen involucra diferentes cambios intracelulares que pueden originar una disminución en la sobrevivencia espermática (Medina *et al.*, 2005), ocasionando alteraciones en los espermatozoides tanto en los parámetros fisiológicos como motilidad y capacidad fecundante (Zhang *et al.*, 2003), así como alteraciones morfológicas (Espinoza *et al.*, 2010) y daño en el ADN (Cabrita *et al.*, 2005). Por ello es necesario contar con metodologías de congelamiento estandarizadas que permitan optimizar la calidad de los espermatozoides criopreservados, de tal manera que los porcentajes de motilidad espermática, fecundación y viabilidad de larvas sean afectados lo menos posible.

En tal sentido, la presente tesis tiene como objetivo determinar los parámetros, técnicas y procesos para la criopreservación de espermatozoides de lenguado *Paralichthys adspersus* condicionados al cautiverio, como parte del desarrollo del proyecto: “Producción de semilla del lenguado *Paralichthys adspersus* en cautiverio: I Mejoramiento de la calidad y cantidad de desoves FINCyT – PIBAP 2009, CONTRATO N° 051”

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. GENERALIDADES

#### 2.1.1. TAXONOMÍA

Reino	<b>Animalia</b>
Phylum	<b>Chordata</b>
Clase	<b>Actinopterygii</b>
Orden	<b>Pleuronectiformes</b>
Familia	<b>Paralichthyidae</b>
Género	<b><i>Paralichthys</i></b>
Especie	<b><i>Paralichthys adspersus</i></b> (Steindachner, 1867)

#### 2.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

El “lenguado común” *Paralichthys adspersus* es un pez plano que se distribuye desde Paíta (Perú) hasta el golfo de Arauco (Chile), incluyendo el archipiélago de Juan Fernández (Pequeño, 1989; Acuña y Cid, 1995 y Siefeld *et al.*, 2003). Es un pez predador, siendo otros peces que comparte su hábitat su principal alimento (Samamé y Castañeda, 1999). El lenguado es un desovador parcial asincrónico (Silva y Oliva, 2010), su época de desove se presenta en condiciones naturales en primavera y verano, es decir entre los meses de octubre y febrero (Samamé y Castañeda, 1999). No presenta dimorfismo sexual externo, sin embargo se reporta una diferencia sexual por tallas, alcanzando las hembras un mayor tamaño que los machos (Samamé y Castañeda, 1999 y Ángeles y Mendo, 2005). Además de una diferencia observada en cuanto a los orificios anal, urinario y genital presentes en hembras (presenta los 3 separadamente) y machos (sólo 2, anal y urogenital) (Ángeles y Mendo, 2005).

## 2.2. ANTECEDENTES

La biología de los espermatozoides ha sido ampliamente estudiada en peces de agua dulce (Piironen J., 1985; Munikittrick y Moccia, 1987; Billard R., 1992; Linhart *et al.*, 2008; Alavi *et al.*, 2010), mientras que en peces marinos se ha incrementado en los últimos años. Tal es el caso de peces marinos como: *Gadus Morhua* (Rouxel *et al.*, 2008) y *Thunnus thynnus* (Suquet *et al.*, 2010), y específicamente en peces planos como *Scophthalmus maximus* (Suquet *et al.*, 1994), *Hippoglossus hippoglossus* (Babiak *et al.*, 2006), *Solea senegalensis* (Cabrita *et al.*, 2006 y Beirão *et al.*, 2009) y *Paralichthys orbignyanus* (Ceccon *et al.*, 2010).

Los espermatozoides son el resultado de un proceso de maduración denominado espermatogénesis, donde se producen células haploides que contienen información genética única con el objetivo de transmitir dicha información a la siguiente generación (Schulz *et al.*, 2010). Por lo tanto, es necesario que la calidad de los espermatozoides sea alta para asegurar la fecundación y obtener una descendencia viable.

La calidad espermática es variable entre las especies y por lo tanto los parámetros que se utilizan en cada especie son los que determinan la calidad. Existen una variedad de parámetros que permiten inferir en la calidad espermática de un plantel de reproductores, dichos parámetros pueden ser el volumen, concentración espermática, la composición del plasma seminal, la integridad de la membrana o la motilidad espermática, entre otros. Sin embargo, estos parámetros no son uniformes entre las especies y se han reportado también variaciones individuales (Rana, 1995). Esto puede ser debido a la variabilidad genética u otros factores externos como el punto de toma de muestra (poro genital), la contaminación de las muestras de espermatozoides con orina o el envejecimiento de los espermatozoides durante la temporada de desove (Suquet *et al.*, 2000).

Por otro lado, la criopreservación de espermatozoides es una técnica que ha sido estudiada y aplicada ampliamente en mamíferos, pero que actualmente también está siendo utilizada en especies tanto de agua dulce como marinas. Se ha aplicado en más de 200 especies de peces de agua dulce como salmónidos, tilapias y carpas (Rana, 1995 y Billard *et al.*, 1995).

El primer reporte en criopreservación de espermatozoides fue hecho por Spallanzani en 1776, quien trabajó en humanos y demostró que los espermatozoides cuando se exponen a temperaturas de refrigeración se inactivan, pero reviven al calentamiento (Spallanzani, 1776). Sin embargo, la historia moderna sólo se inició en 1949 con Polge *et al.*, cuando publicaron la criopreservación de espermatozoides humanos utilizando glicerol como crioprotector.

En especies marinas, el trabajo de Blaxter (1953) en criopreservación de esperma de *Clupea harengus* marcó los inicios de las investigaciones, realizándose posteriormente en diferentes especies. En moluscos como *Mesodesma donacium* (Joo y Dupré, 2002) y *Argopecten purpuratus* (Dupré y Espinoza, 2004), peces como *Sillago ciliata* (Young *et al.*, 1992), *Macrozoarces americanus* (Yao *et al.*, 2000), *Thunnus orientalis* (Gwo *et al.*, 2005) *Lutjanus argentimaculatus* (Vuthiphandchai *et al.*, 2009) y peces planos como *Hippoglossus hippoglossus* (Bolla *et al.*, 1987), *Pleuronectes platessa* (Pullin, 1972), *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson *et al.*, 1999), *Pseudopleuronectes americanus* (Rideout *et al.*, 2003), *Paralichthys olivaceus* (Zhang *et al.*, 2003), *Scophthalmus maximus* (Chen *et al.*, 2004), *Verasper variegates* (Liu *et al.*, 2006) y *Paralichthys orbignyanus* (Ceccon *et al.*, 2008).

Se han realizado con éxito procesos de criopreservación de espermatozoides de peces planos empleando diferentes crioprotectores y concentraciones como: propilénglicol 10%



(Richardson *et al.*, 1999), glicerol 12% (Zhang *et al.*, 2003), dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (Chen *et al.*, 2004), dimetilsulfóxido con sucrosa al 10% (1.40 M) (Ceccon *et al.*, 2008) entre otros, así como a diversas tasas de congelamiento de 19.5 y 7.2 °C/min (Richardson *et al.*, 1999), 31 y 18.6 °C/min (Chen *et al.*, 2004) y tasas de descongelamiento 37 °C/min (Chen *et al.*, 2004), desde 28 °C hasta su descongelamiento total (Zhang *et al.*, 2003) y 74 °C/min (Ceccon *et al.*, 2008).

La optimización de los protocolos de criopreservación permiten obtener tasas de motilidad y fecundación similares a los obtenidos con semen fresco (Medina *et al.*, 2005), pero dichos resultados tienen una estrecha relación con diferentes factores determinantes como: el crioprotector, las tasas de congelamiento y descongelamiento; lo cuales deben ser manejados con la finalidad de prevenir la formación de cristales de hielo para evitar la destrucción de las estructuras celulares internas que son vitales para las funciones metabólicas (Storey, 1990). Por ello, evaluar cada uno de estos factores resulta indispensable el desarrollo de un protocolo de criopreservación.

## **2.3. BASES TEÓRICAS**

### **2.3.1. CALIDAD ESPERMÁTICA**

La calidad del semen se mide habitualmente por la capacidad para fecundar los huevos y producir descendencia viable, aunque el éxito de la fecundación no solo está relacionado con la calidad espermática sino también con la calidad de los huevos (Rurangwa *et al.*, 2004). Actualmente se ha determinado que existen otros parámetros o marcadores biológicos de la calidad del espermatozoide, los cuales se relacionan directamente con la capacidad de fecundación permitiendo inferir en la calidad espermática. Dichos marcadores biológicos incluyen composición del líquido seminal, volumen de semen, densidad de espermatozoide, motilidad, pH, osmolaridad, viabilidad, morfología y ultraestructura

del espermatozoide, integridad de la membrana y contenido energético (Suquet *et al.*, 1994; Rurangwa *et al.*, 2004; Cabrita *et al.*, 2008; Beirão *et al.*, 2009; Ceccon *et al.*, 2010; Fauvel *et al.*, 2010).

Los parámetros biológicos pueden ser variables es decir, se presentan cambios en las características de los espermatozoides de los peces de forma natural durante la temporada reproductiva. Tal es el caso de *Psetta maxima* e *Hippoglossus hippoglossus*, que registraron una disminución en el porcentaje de motilidad de los espermatozoides y un aumento lineal de la densidad celular durante la época reproductiva (Suquet *et al.*, 1998, Babiak *et al.*, 2006). En *Solea senegalensis*, se observó un aumento del volumen espermático durante algunos meses del año que coincide con la época reproductiva de las hembras (Cabrita *et al.*, 2006) y en *Paralichthys orbignyanus* hubo un incremento en la producción de espermatozoides desde el inicio al final de época reproductiva (Ceccon *et al.*, 2010). En tal sentido, los cambios observados en la calidad del espermatozoide de diferentes especies no siguen el mismo patrón y por lo tanto las alteraciones en la calidad del espermatozoide son especie-específicas (Ceccon *et al.*, 2010).

#### **2.3.1.1. Parámetros básicos de calidad espermática**

Los parámetros estándar que permiten un rápido análisis son: la medición del volumen del semen, la concentración de espermatozoides y espermatozoide, la evaluación subjetiva de la motilidad, viabilidad y composición del plasma seminal.

- *Concentración espermática*

La concentración de espermatozoides en el líquido seminal se ha utilizado tradicionalmente para la evaluación de la calidad espermática de peces. El método estándar para determinar la densidad del espermatozoide (espermatozoides / ml espermatozoide) en el

semen de los peces utiliza un hematocitómetro o una cámara de recuento similar para contabilizar los espermatozoides en la muestra. (Buyukhatipoglu y Holtz, 1984).

La concentración espermática es un parámetro variable entre congéneres y especies dentro de la temporada reproductiva. Sin embargo, se convierte en una característica relevante al momento de la fecundación, ya que con un volumen constante de espermatozoides se puede analizar la capacidad fecundante de diferentes muestras de semen (Rurangwa *et al.*, 2004)

- *Motilidad Espermática*

Es el parámetro más comúnmente utilizado para determinar la calidad del espermatozoide, ya que es el factor decisivo para que el espermatozoide llegue a fecundar al ovocito. La motilidad de espermatozoides se activa por diversos factores físicos, químicos y fisiológicos que dependen de la especie y del medio donde habita (Valdebenito *et al.*, 2009). Entre los factores que desencadenan la motilidad se encuentran los cambios en la presión osmótica (Alavi y Cosson, 2006), los cambios iónicos entre el medio extra e intracelular (Kho *et al.*, 2005; Ohtake, 2003) o variaciones en el pH (Hoang *et al.*, 2010).

La motilidad espermática se puede estimar subjetivamente bajo microscopía óptica y para ello se emplean escalas arbitrarias, que presenta rangos basados en los porcentajes de motilidad espermática (Doi *et al.*, 1992, Ceccon *et al.*, 2008). Por otro lado, también se emplean programas computarizados que permiten evaluar parámetros de motilidad como CASA (Computer Assisted Semen Analysis), con el cual la mayoría de los autores trabajan, aplicando descriptores prestados por este software para describir el comportamiento de los espermatozoides de forma objetiva y cuantitativa (Kime *et al.*, 2001).

Finalmente, este parámetro no se usa sólo para evaluar la calidad del espermatozoide para fines productivos, sino también para estudiar el efecto de diferentes tratamientos hormonales en reproductores (Cabrita *et al.*, 2011 y Schiavone *et al.*, 2006) o la manipulación de espermatozoides como la criopreservación (Riley *et al.*, 2004 y Ceccon *et al.*, 2008).

- *Viabilidad Espermática*

La viabilidad se refiere a la integridad de la membrana espermática, este tipo de pruebas se basan en protocolos de doble tinción con la finalidad de diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos (Rurangwa *et al.*, 2004). Entre dichos protocolos cabe mencionar a la técnica dual con eosina y nigrosina, y la técnica con tintes fluorescentes. La primera evalúa la viabilidad en base a la absorción del colorante eosina por la cabeza del espermatozoide, donde los espermatozoides vivos no muestran una captación del colorante, mientras que en los espermatozoides muertos hay una captación parcial o completa (Vuthiphandchai *et al.*, 2009). La segunda se basa en fluorocromos como el SYBR 14 que tiñe los ácidos nucleicos de los espermatozoides vivos y es permeable a la membrana a diferencia del yoduro de propidio que no es capaz de atravesar la membrana de las células vivas, pero es capaz de penetrar y teñir el ADN nuclear de los espermatozoides muertos o degenerados (Cabrita *et al.*, 2005 y Paniagua *et al.*, 2006).

Existen otras técnicas para evaluar la viabilidad de espermatozoides como: la citometría de flujos, instrumento que mide la intensidad de los colorante fluorescentes asociados a células individuales, ha sido aplicado en espermatozoides de peces de agua dulce por Flajšhans *et al.* (2004), la técnica de Anexina-V, que se basa en la unión de esta proteína con un fosfolípido de la membrana plasmática durante la apoptosis (Beirão *et al.*, 2009) y

el NucleoCounter SP-100 (Chemometec, Dinamarca) que se basa en análisis computarizado de células teñidas con yoduro de propidio (Nynca y Ciereszko, 2009).

Entre otros parámetros básicos tenemos:

- *Espermatocrito y densidad óptica*

Estos parámetros también son utilizados para determinar de manera rápida la densidad del esperma. El espermatocrito se determina mediante centrifugación para calcular la proporción del volumen de semen compactado en la pajilla al volumen total de semen por 100 mientras que la densidad óptica se determina mediante espectrofotometría (Rurangwa *et al.*, 2004). Tvedt *et al.* (2001) halló que existe una relación directa de la densidad de esperma con la densidad óptica y espermatocrito de esperma de algunos peces.

- *Composición del Plasma Seminal*

El plasma seminal tiene una función físico-endocrinológica después de la liberación de los espermatozoides desde los testículos hasta el conducto del esperma y, posteriormente, en el medio acuático (Alavi *et al.*, 2007). Su composición refleja las condiciones en que ocurre la espermatogénesis, como posibles procesos de envejecimiento, alteraciones metabólicas, contaminación u otros factores que afecten la calidad del esperma (Cabrita *et al.*, 2008). La evaluación del plasma seminal es importante no solo por lo anteriormente mencionado, sino porque se hallan compuestos que están involucrados en el proceso de activación de la motilidad espermática como: sodio, potasio, cloruro, calcio y magnesio (Alavi y Cosson, 2006).

### 2.3.2. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

La criopreservación es el proceso de preservación de células, tejidos u organismos vivos a temperaturas bajo cero, por lo general  $-197^{\circ}\text{C}$  utilizando nitrógeno líquido (NL). La criopreservación comprende el congelamiento, el almacenamiento criogénico y el descongelamiento de la materia viva (Tiersch y Mazik, 2000). Un protocolo de criopreservación tiene como objetivo preservar las células manteniendo su integridad estructural y funcional similar a los no preservados (en fresco).

La criopreservación de espermatozoides, posee muchas ventajas que hacen de esta técnica una herramienta útil para la reproducción asistida de las especies. Los protocolos de criopreservación de espermatozoides se han establecido para varias especies (Cabrita *et al.*, 2008) y se aplica con diferentes propósitos. En los peces, las ventajas han sido revisadas por varios autores (Cabrita *et al.*, 2010; Tiersch *et al.*, 2007) como: 1) la sincronización de la disponibilidad de gametos de ambos sexos, 2) la economía de los espermatozoides, es decir cuando el volumen existente es un factor limitante, 3) la simplificación del manejo de reproductores y programas de mejoramiento genético, ya que la criopreservación permite que la manipulación de los reproductores se reduzca y por lo tanto, simplifique los procedimientos en la acuicultura, 4) la disminución de los costos ocasionados por el mantenimiento de los machos y facilitar el transporte de gametos entre centros de cultivo, y finalmente 5) el almacenamiento del germoplasma para la selección genética en el caso de programas de conservación.

El proceso de criopreservación puede ocasionar una disminución en la calidad del espermatozoide afectando diferentes estructuras como: la membrana celular, la estructura de las mitocondrias, cromatina, axonema etc., debido a que se presentan cuatro períodos críticos. Cloud y Patton (2008) llegaron a la conclusión que dichos periodos son: 1)

enfriamiento de las células hasta el punto de formación de hielo, teniendo en cuenta que las células no deberían estar expuestas a una serie de cambios de temperatura; 2) la formación de hielo asociado al calor de fusión, es decir el enfriamiento de la células y el medio que las rodea ocasiona la formación de hielo extracelular; 3) el enfriamiento a través del período crítico (-10 a -40 ° C), donde el movimiento del agua fuera de las células causa un aumento en la concentración intracelular de sales, y 4) la reducción de la temperatura del nitrógeno líquido (NL). En este sentido, el éxito de los protocolos de criopreservación se ve afectado por diversos aspectos, y su optimización es una de las áreas prioritarias de investigación, ya que es altamente específico de la especie.

Los protocolos de criopreservación requieren de ciertas modificaciones de acuerdo a las características fisiológicas de cada especie, por ello para establecer un protocolo de criopreservación deben de evaluarse tanto el diluyente y el crioprotector, así como la condiciones de congelamiento y descongelamiento.

#### **2.3.2.1. Diluyentes**

El semen puro no suele ser adecuado para la congelación, por lo que se requiere la utilización de los diluyentes. Los más utilizados en peces marinos son la solución salina (concentración 1-10%) o soluciones de azúcar (5-10%) (Suquet *et al.*, 2000). Estos diluyentes han sido formulados simulando la composición y osmolaridad del plasma seminal de cada especie, con el propósito de incrementar el volumen de semen e inhibir la motilidad espermática (Medina *et al.*, 2005).

#### **2.3.2.2. Crioprotectores**

Los crioprotectores son compuestos que tienen como función específica dentro del proceso de crioconservación, mantener la viabilidad celular y proteger al espermatozoide

de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y los cambios de temperatura (Medina *et al.*, 2005). Además, proporcionan protección a la célula durante el proceso de deshidratación, reemplazando el contenido de agua de la célula en el caso de los crioprotectores permeables o la estabilización de la membrana durante el proceso de criopreservación, en el caso de los no permeables (Tiersch *et al.*, 2007).

Los crioprotectores permeables penetran la membrana celular porque son sustancias que poseen bajos pesos moleculares tales como glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2-propanodiol, butanediol, acetamida y dimetilsulfóxido (DMSO). Mientras que los no permeables no penetran la membrana celular debido a su alto peso molecular como el polivinilalcohol (PVA), hialuronato de sodio y la albúmina (Suquet *et al.*, 2000).

En los protocolos de criopreservación, los crioprotectores son variables de acuerdo a su concentración y a la especie en la que se utilizan, es decir son especie-específicos. Por lo tanto, estos deben de ser evaluadas cuando se requieran aplicar en nuevas especies.

#### **2.3.2.3. Tasa de congelamiento**

El proceso de criopreservación, requiere disminuir la temperatura gradualmente y de manera controlada para minimizar los daños ocasionados por el choque osmótico o por formación de cristales de hielo (Dupre y Espinoza, 2004), entonces evaluar la tasa de congelamiento es un punto crítico para el desarrollo del protocolo de criopreservación y es la variable menos estandarizada en los estudios de crioconservación en peces (Rana, 1995).

Cloud y Patton (2008), explican que la tasa de congelación debe ser lo suficientemente lenta como para permitir el movimiento del agua fuera de las células de modo que no se



formen cristales intracelulares, y lo suficientemente rápida como para evitar que el aumento de la concentración intracelular de sales afecte a los componentes celulares.

Las metodologías y las curvas de congelamiento son variadas, en peces se han empleado congelación espermática en vapores de NL (Yao *et al.*, 2000), utilizando congeladores automáticos (Chen *et al.*, 2004) y mecánicos (Catcoparco *et al.*, 2010).

#### **2.3.2.4. Tasa de descongelamiento**

La descongelación es un parámetro sensible y variable, ya que los rangos de temperaturas de descongelación de células son diferentes dentro y entre especies (Medina *et al.*, 2005). Incluso bajo condiciones óptimas de congelación una pequeña cantidad de cristales de hielo intracelular puede someterse a cristalización y causar daño celular (Woods *et al.*, 2004). Por lo tanto, una tasa de descongelación rápida puede minimizar la cristalización mediante la reducción del tiempo durante el cual las células deshidratadas pueden absorber la cantidad de agua que se pierde durante la congelación (Suquet *et al.*, 2000).

Finalmente, la criopreservación puede causar daños sobre los espermatozoides debido al choque térmico, exposición a crioprotectores y formación de cristales de hielo (Watson, 2000). Este criodaño afecta los parámetros fisiológicos de los espermatozoides como la motilidad y ocasionan alteraciones morfológicas o daños en el ADN (Li *et al.*, 2006). Por ello, es importante la evaluación de cada proceso durante la criopreservación con la finalidad de estandarizar un protocolo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar parámetros, técnicas y procesos para la criopreservación de espermatozoides de lenguado *Paralichthys adspersus*.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer los parámetros para evaluar la calidad espermática de *P. adspersus* mediante la medición de volumen, concentración, motilidad y viabilidad espermática.
- Determinar el crioprotector y su concentración óptima, evaluando la motilidad espermática post-incubación.
- Determinar la tasa de congelamiento por medio de la medición de la velocidad de congelamiento.
- Evaluar la condición espermática post-congelamiento a través de la motilidad espermática.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. MATERIALES**

#### **4.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

Ejemplares machos y hembras de la especie *Paralichthys adspersus* de origen salvaje acondicionados en el laboratorio.

#### **4.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO**

Papel toalla, algodón, guantes quirúrgicos, bandejas plásticas, balanza electrónica (Mettler Toledo), ictiómetro, identificadores electrónicos para peces (PIT tag), láminas portaobjetos, láminas cubreobjetos, cámara de Neubauer (Neubauer Improved Bright line – BRAND 0.00025mm<sup>3</sup>), tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, crioviales, cámaras de cultivo de 24 pocillos, micropipetas de 1 a 1000 µL, jeringas de 1 mL, agujas hipodérmicas, frasco de vidrio oscuro y papel filtro (Whatman 40).

#### **4.1.3. EQUIPOS**

- *Mantenimiento de peces*

La sala de reproductores de peces está formada por 4 sistemas de recirculación, cada uno de ellos con dos tanques de 2,5 m<sup>3</sup> de capacidad, equipados con: biofiltros (Aquaculture System Technologies), bombas de agua (Iwaki Magnet Pump), bombas de calor (Aqualogic Delta Star), sistemas de esterilización por radiación ultravioleta (Smart by Emperor Aquatics), además se tiene un sistema de iluminación controlada para cada sistema de recirculación y sensores de temperatura (TidbiT v2) para cada tanque de cultivo. Entre los equipos para la medición de la calidad de agua se utilizó: pH-metro (Hanna), oxímetro (Thermoscientific), kits para amonio, nitrito, nitrato y dióxido de carbono (La motte).

- *Calidad Espermática y Criopreservación*

Microscopio óptico (MEIJI), microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E-600-POL), congelador mecánico, tanque de nitrógeno líquido de 35 L (International Cryogenic Inc.).

#### **4.1.4. REACTIVOS QUÍMICOS**

Tricaine – S (MS-222), Acetato de Buserelina (0,0042 mg/mL), cloruro de sodio (NaCl), dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol (GLY), propilénglicol (PG), etilénglicol (EG), nitrógeno líquido (NL), kit de viabilidad espermática LIVE/DEAD® (Molecular Probes, Inc.), eosina, nigrosina, peróxido de hidrógeno (30%).

### **4.2. MÉTODOS**

#### **4.2.1. OBTENCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE REPRODUCTORES**

Los ejemplares de lenguados adultos fueron colectados en el área nor-central de Lima (Figura 2) por pescadores artesanales de cada zona de colecta, utilizando la red denominada atarraya como medio de captura. Luego fueron transportados y acondicionados en el Laboratorio de Cultivo de Peces del Centro de Investigaciones Acuícolas (CIA) Alexander Von Humboldt del IMARPE (Figura 3).

Los peces fueron estabulados en tanques de 2,5 m<sup>3</sup> de capacidad conectados a sistemas de recirculación de agua de mar manteniendo la temperatura del agua entre 15 y 16 °C, aireación permanente y fotoperiodo de 11 L : 13 O. Los peces se alimentaron con trozos de “anchoveta peruana” *Engraulis ringens*, debido a que forma parte de su dieta en condiciones naturales (Samamé y Castañeda, 1999). La tasa de alimentación utilizada fue 2,5 % de la biomasa total, en raciones interdiarias.

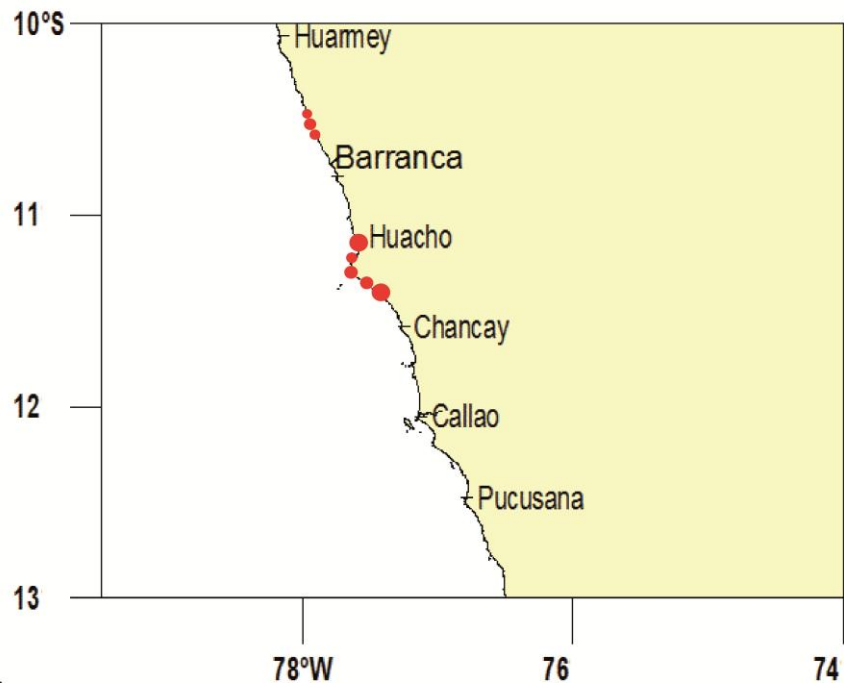


Figura 2. Zonas de colecta (puntos rojos)



Figura 3. Laboratorio de Cultivo de Peces (IMARPE).

Así mismo, los peces fueron marcados individualmente con identificadores electrónicos (Anexo 1), colocados intramuscularmente a la altura de la aleta superior. Se registraron los datos biométricos (longitud y peso total) de cada pez y se determinó el sexo mediante extracción de gametos por biopsia ovárica o canulación (consiste en introducir a través del oviducto una sonda plástica) en caso de las hembras y por presión abdominal en los machos; luego se procedió a la desparasitación mediante inmersión en agua dulce durante 10 minutos. Finalmente los peces fueron colocados en los tanques de cultivo en una proporción sexual 1:2 machos y hembras.

Los peces se acondicionaron al cautiverio por un periodo de año y medio, y las pruebas se llevaron a cabo durante la etapa no reproductiva de la especie entre los meses de mayo a agosto, manteniendo en promedio las siguientes condiciones de cultivo: temperatura del agua  $15.82 \pm 0.51$  °C, pH  $7.69 \pm 0.23$ , oxígeno disuelto  $9.27 \pm 0.80$  mg/L, dióxido de carbono  $9.4 \pm 1.67$  ppm, nitrógeno amoniacal  $0.16 \pm 0.07$  ppm, nitrito  $0.42 \pm 0.16$  ppm y nitrato  $1.67 \pm 0.79$  ppm.

#### **4.2.2. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN**

Previamente, los peces fueron inducidos con 0.2 mL/Kg de la hormona LH-RHa (Acetato de Buserelina con una concentración de 0,0042 mg/mL), mediante una inyección intraperitoneal. A los 7 días post-inyección se realizó la extracción de la muestra de semen, para ello los peces se anestesiaron por inmersión en una solución de Tricaine – S (MS-222) con agua de mar (concentración de 80 mg/L). Una vez adormecidos se limpió la zona del poro genital con papel toalla para evitar cualquier tipo de contaminación de la muestra con agua de mar u orina, ya que la motilidad espermática podría verse afectada (Dreanno *et al.*, 1998 y Poupard *et al.*, 1998). Luego, se realizó una ligera presión abdominal, para obtener la muestra de semen (Figura 4).

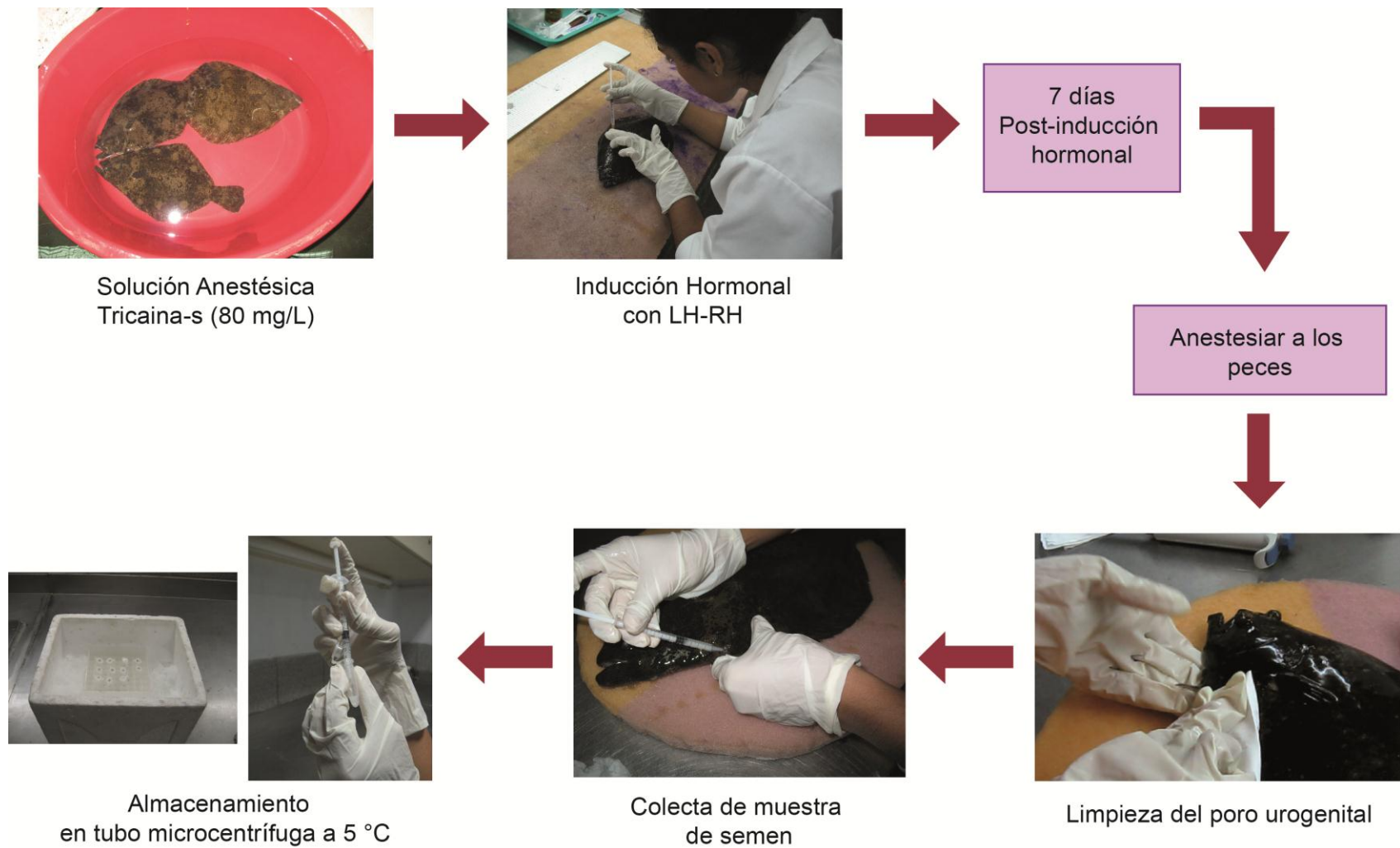


Figura 4. Extracción de la muestra de semen.

### **4.2.3. EVALUACIÓN DE CALIDAD ESPERMÁTICA**

#### **4.2.3.1. Evaluación del volumen espermático**

El semen fue colectado directamente con una jeringa graduada sin aguja (1mL) y el volumen obtenido fue registrado (Ceccon *et al.*, 2010). Posteriormente, cada muestra de semen fue transferida a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y almacenada a aproximadamente 5 °C en la cámara de frío (Figura 4).

#### **4.2.3.2. Evaluación de la concentración espermática**

Para determinar la concentración espermática, la muestra de semen se diluyó en solución salina (SS). Se extrajo 10 µL de la muestra de semen (S) con una micropipeta de 10-100 µL y se colocó en un tubo de microcentrífuga con 90 µL de SS para formar la solución espermática (SE). Luego se extrajo 10 µL de SE y se colocó en un pocillo de la placa de cultivo con 190 µL de SS para obtener la dilución 1 (D1). Por último se extrajo 10 µL de D1 y se colocó en otro pocillo de la placa de cultivo con 90 µL de SS para obtener la dilución 2 (D2). Todas las muestras de semen se almacenaron a ~ 5 °C en la cámara de frío (Figura 5).

Para el conteo, se colectó una alícuota de D2 con una micropipeta y se colocó en la cámara de Neubauer. Se observó la muestra al microscopio óptico a 400 X y se evaluó 3 campos diferentes de la cámara de Neubauer por triplicado. Se calculó el promedio de los campos evaluados de cada muestra y se aplicó la siguiente fórmula:

$$[\text{Concentración espermática}]_{\text{esp/mL}} = N \times 5 \times 10^8$$

Dónde: N= promedio del número de espermatozoides.



#### 4.2.3.3. Evaluación de la motilidad espermática

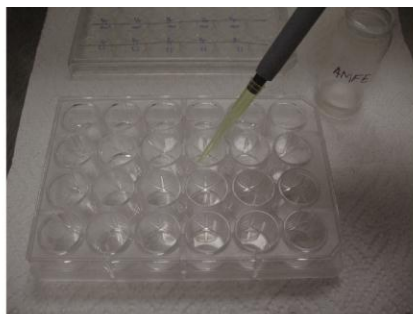
La motilidad espermática se evaluó activando 10 µL de semen (D1), con 90 µL de agua de mar microfiltrada y esterilizada (AMFE) (Figura 5). La motilidad se evaluó utilizando una cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico (magnificación: 400X) a los 0, 1, 2, 3 y 4 minutos (min) post-activación. La motilidad se estimó utilizando una escala arbitraria, que va desde 0 a 5, donde 0 representa ninguna motilidad; 1, 1 - 25%; 2, 26 - 50%; 3, 51 - 75%; 4, 76 - 90% y 5, 91 - 100% de espermatozoides móviles (Borges *et al.*, 2005 y Ceccon *et al.*, 2010), se calculó el porcentaje de motilidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Motilidad} = \frac{\# \text{ Espermatozoides móviles}}{\# \text{ Espermatozoides totales}} \times 100\%$$

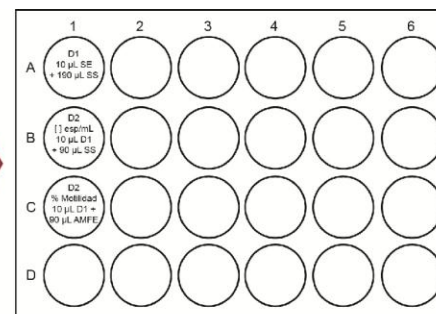
Donde los espermatozoides móviles son aquellos que tienen un desplazamiento progresivo (movimiento constante).



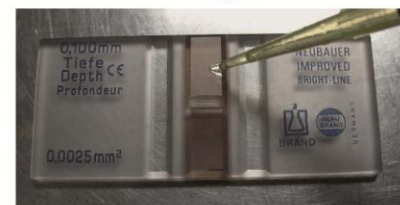
Muestra de semen diluidas en SS almacenada a 5 °C.



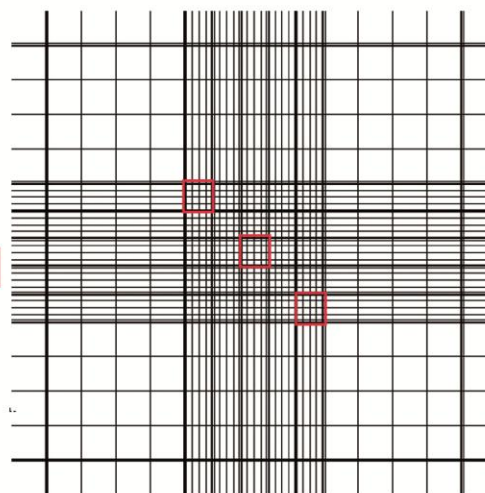
Placa de cultivo celular



Diluciones en la placa de cultivo celular



Cámara de Neubauer



Cuadrículas de la Cámara de Neubauer



Evaluación en el microscopio

Figura 5. Evaluación de la concentración y motilidad espermática.

#### 4.2.3.4. Evaluación de la viabilidad espermática

La viabilidad espermática se determinó mediante dos técnicas de tinción que evalúan la integridad de la membrana celular, diferenciando células vivas de muertas. El porcentaje de viabilidad se evaluó por triplicado contando un mínimo de 200 espermatozoides y se aplicó la siguiente fórmula:

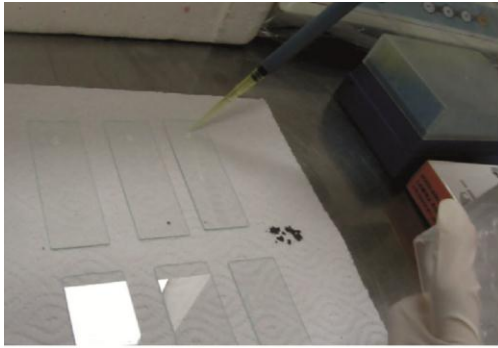
$$\% Viabilidad = \frac{\# Espermatozoides viables}{\# Espermatozoides totales} \times 100\%$$

Las técnicas de viabilidad espermática fueron validadas tiñendo muestras de semen expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 30 min a ~ 5 °C.

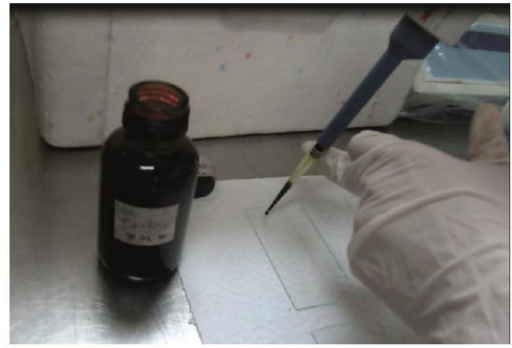
##### *a) Viabilidad espermática por Tinción Eosina –Nigrosina*

Se preparó 50 mL de solución eosina-nigrosina (5% eosina y 10% nigrosina), para ello se mezcló 2.5 g de eosina con 5 g de nigrosina, se enrazó con agua destilada a un volumen de 50 mL. Luego, se mezcló utilizando un agitador magnético a 40 °C, se filtró (papel filtro Whatman 40) dos veces y se almacenó a 5°C en un frasco oscuro.

Para determinar la viabilidad espermática, sobre una lámina portaobjeto se mezcló 10 µL de semen diluido (D2) con 10 µL de solución Eo-Nig, se realizó un frotis a lo largo de la lámina portaobjeto y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min (Figura 6). La viabilidad espermática se evaluó en base a la tinción de la cabeza del espermatozoide. Los espermatozoides viables no muestran tinción y se visualizan brillantes sobre el fondo oscuro, mientras que los espermatozoides muertos tenían la cabeza teñida de rojo de forma parcial o total. Las muestras se evaluaron bajo un microscopio óptico a 400 ó 1000X de magnificación (Vuthiphandchai *et al.*, 2009) (Figura 7).



10  $\mu$ L de semen diluido sobre lámina portaobjeto



Adicionar 10  $\mu$ L de solución Eo-Nig



Realizar frotis utilizando un cubreobjetos y dejar secar por 15 min a T °C ambiente



Observar al microscopio óptico

Figura 6. Viabilidad espermática por Técnica Eosina-Nigrosina.

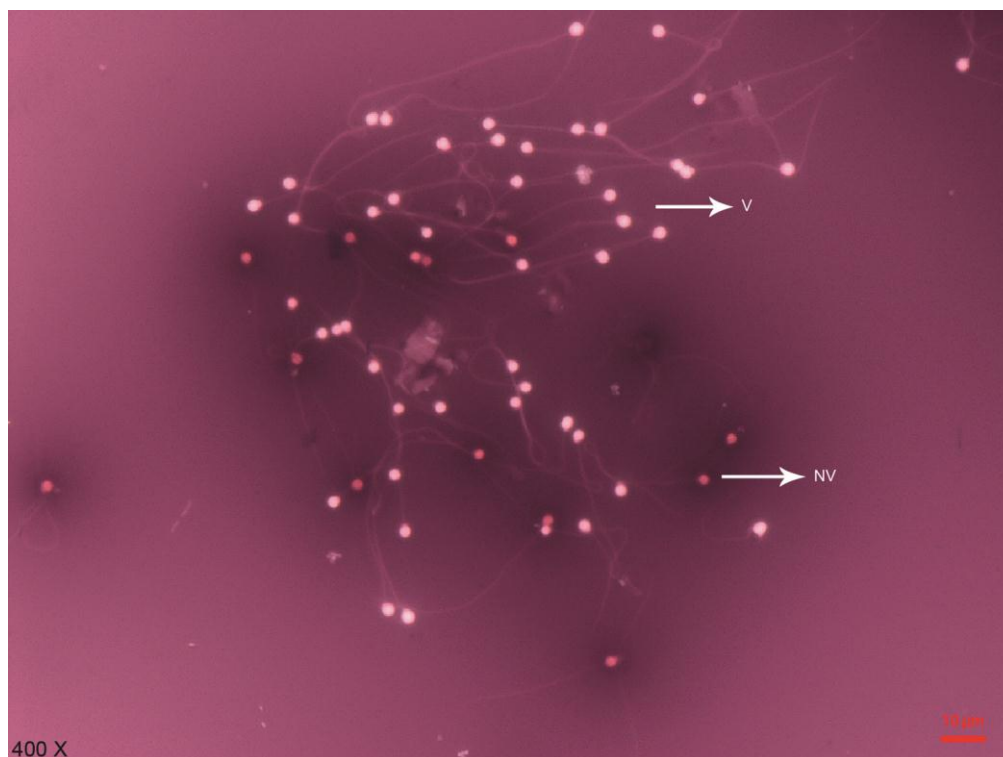


Figura 7. Tinción Eosina-Nigrosina, espermatozoides viables (V) y no viables (NV).

*b) Viabilidad espermática por Tinción Live/Dead® Sperm Viability Kit*

Se utilizó el kit LIVE/DEAD® de viabilidad espermática, el cual diferencia las células vivas de las muertas con SYBR14 y yoduro de propidio (IP), respectivamente. Se preparó una solución stock de SYBR14 con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 0.1 mM.

Para teñir los espermatozoides, se mezcló en un tubo de microcentrífuga 90 µL de semen diluido (D2) con 10 µL solución stock SYBR14 y se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se añadió 10 µL yoduro de propidio 2.4mM y se dejó incubar por 10 min bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, siendo la concentración final de los tintes fluorescentes SYBR 14 a 100 nM e IP a 24 µM (Paniagua *et al.*, 2006).

Para determinar la viabilidad espermática, sobre una lámina portaobjeto se agregó 50  $\mu\text{L}$  de los espermatozoides teñidos, se colocó un cubreobjetos y se almacenó fuera de la luz. Las muestras se evaluaron bajo microscopia de epifluorescencia a 400X de magnificación con un filtro azul de onda de excitación 450-490 nm (Figura 8). La viabilidad espermática se evaluó en base a la tinción de la cabeza del espermatozoide. Los espermatozoides viables (vivos) estuvieron teñidos con SyBr14 (fluorescencia verde) mientras que los no viables (muertos) con IP (fluorescencia roja) (Figura 9).

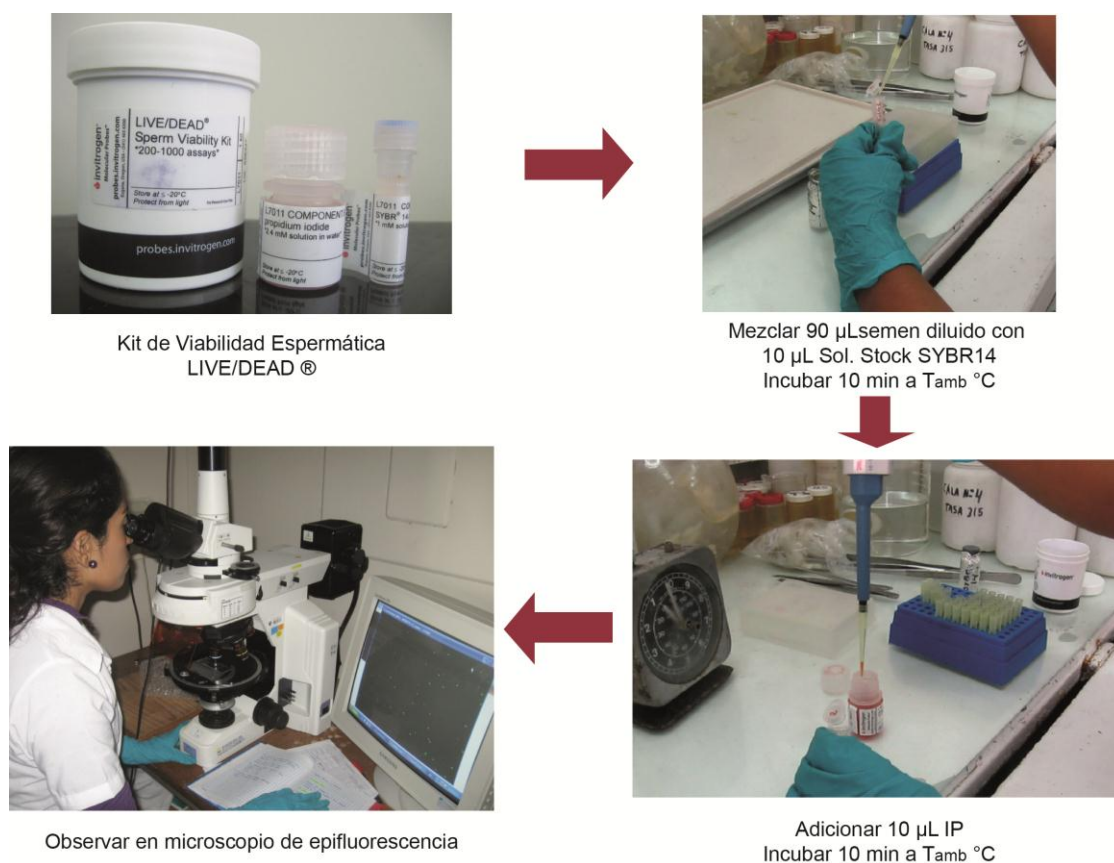


Figura 8. Viabilidad espermática por Kit LIVE/DEAD®.

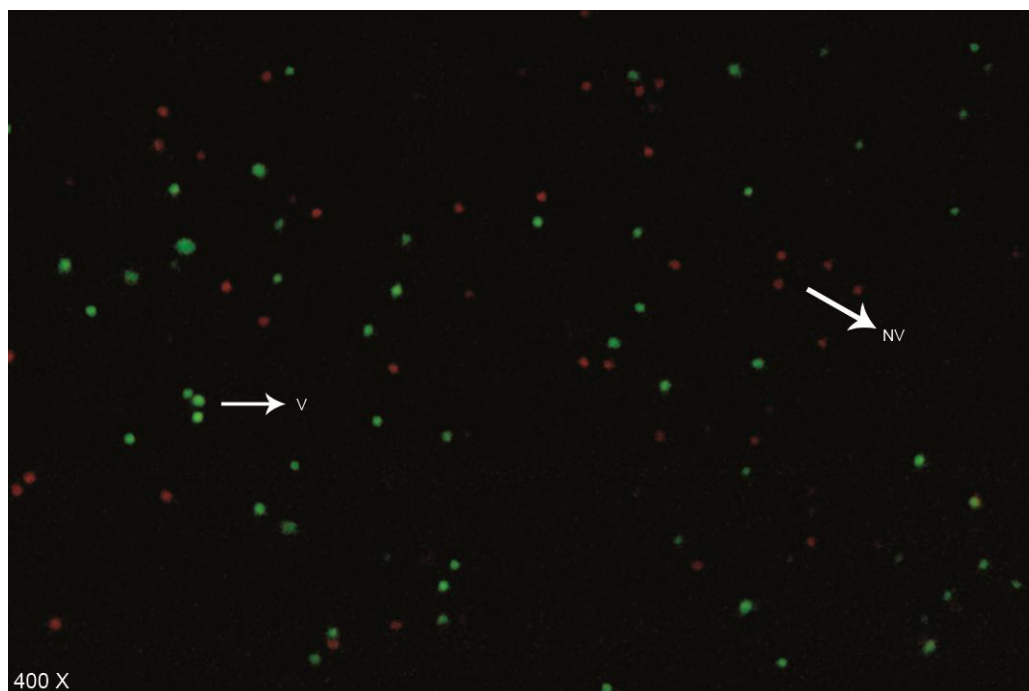


Figura 9. Tinción Kit LIVE/DEAD<sup>®</sup>, espermatozoides viables (V) y no viables (NV).

#### 4.2.4. ENSAYOS EN CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

##### 4.2.4.1. Evaluación de la toxicidad de crioprotectores

Se prepararon tubos de microcentrífuga con 190  $\mu$ L de 4 soluciones crioprotectoras: dimetilsulfóxido (DMSO), propilénglicol (PG), etilénglicol (EG) y glicerol (GLY), a concentraciones molares de: 1.0, 1.5 y 2.0 M, diluidos en solución salina (Figura 10) y se almacenaron a 4 °C.

Se extrajo la muestra de semen con la misma metodología utilizada en la evaluación de la calidad espermática, pero para este caso solo se colectó 10  $\mu$ L de semen utilizando una micropipeta. La muestra se colocó en un tubo de microcentrífuga con 90  $\mu$ L de SS formando la SE y se evaluó su motilidad espermática en fresco.

Luego, se colocó en cada tubo de microcentrifuga 10  $\mu\text{L}$  de SE con la solución crioprotectora y se dejó incubar por 10 min a una temperatura de  $\sim 5^\circ\text{C}$  en la cámara de frío. Para evaluar la motilidad espermática post-incubación en las soluciones crioprotectoras, se colocó 90  $\mu\text{L}$  de AMFE en un pocillo de la cámara de cultivo celular y se agregó 10  $\mu\text{L}$  de la muestra incubada. Inmediatamente se colectó una alicuota con una micropipeta y se colocó en la cámara de Neubauer. La muestra se observó bajo microscopía óptica a 400 X a los 0, 1, 2, 3 y 4 minutos post-activación con AMFE en 3 campos diferentes de la cámara de Neubauer, aplicando la fórmula descrita anteriormente para el porcentaje de motilidad espermática.

#### **4.2.4.2. Evaluación de las tasas de congelamiento con el crioprotector óptimo**

Para realizar estas pruebas, primero se eligió el crioprotector y la concentración con la cual se obtuvo el mayor porcentaje de motilidad y se evaluaron 5 tasas de congelamiento ( $-15$ ,  $-30$ ,  $-45$ ,  $-60$  y  $-75^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

Para determinar la mejor tasa de congelamiento del semen, se aplicó la misma metodología que para la evaluación de la calidad espermática, pero para este propósito se tomó una muestra de 30  $\mu\text{L}$  de semen con la micropipeta. La muestra se colocó en un tubo de microcentrifuga con 270  $\mu\text{L}$  de SS formando la SE, se evaluó su motilidad espermática en fresco y para su almacenamiento se colocó la muestra en crioiales a  $\sim 5^\circ\text{C}$  en la cámara de frío.

Se preparó el equipo de congelamiento mecánico portátil según el modelo descrito por Dupré y Espinoza (2004) y se rotularon los crioiales con el número de muestra, la tasa de congelamiento y descongelamiento. El equipo de congelamiento consta de un termo



de nitrógeno líquido de boca ancha de 2 L de capacidad, una placa porta muestras, una polea que permite el movimiento de la placa y una regla para poder determinar las velocidades de descenso. Antes de cada congelamiento, se colocó 250 mL de nitrógeno líquido (NL) al termo de 2 L de capacidad y se mantuvo cerrado durante 5 min para estabilizarlo.

Luego, se extrajo 10  $\mu$ L de SE y se colocó en crioviales con 190  $\mu$ L de la solución crioprotectora. Inmediatamente los crioviales se colocaron en la placa porta muestras del congelador y se mantuvieron sobre la superficie del termo de NL durante 5 min, a continuación las muestras se introdujeron en el termo a una velocidad constante de hasta llegar a 1 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido donde permanecieron un minuto, de esta manera se evaluaron tasas de congelamiento de -15, -30, -45, -60 y -75 °C/min de acuerdo a la metodología descrita por Dupre y Espinoza (2004), y Catcoparco *et al.* (2010). Finalmente las muestras se guardaron en el tanque de NL de 35 L (Figura 10).

#### **4.2.4.3. Evaluación de tasas de descongelamiento**

Después de 7 días, las muestras se descongelaron a dos tasas: tasa de descongelamiento 1 (TD1), donde las muestras se descongelaron por inmersión de los crioviales en agua a 50 °C durante 60 s, y la tasa de descongelamiento 2 (TD2) a temperatura ambiente hasta que la muestra se descongele completamente. Para evaluar la motilidad espermática post-congelamiento, se colocó 90  $\mu$ L de AMFE en un pocillo de la cámara de cultivo celular y se agregó 10  $\mu$ L de la muestra criopreservada. Inmediatamente se colectó una alícuota con una micropipeta y se colocó en la cámara de Neubauer. La muestra se observó bajo microscopía óptica a 400 X a los 0, 1, 2, 3 y 4 minutos post-activación en AMFE en 3 campos diferentes de la cámara de Neubauer (Figura 10).

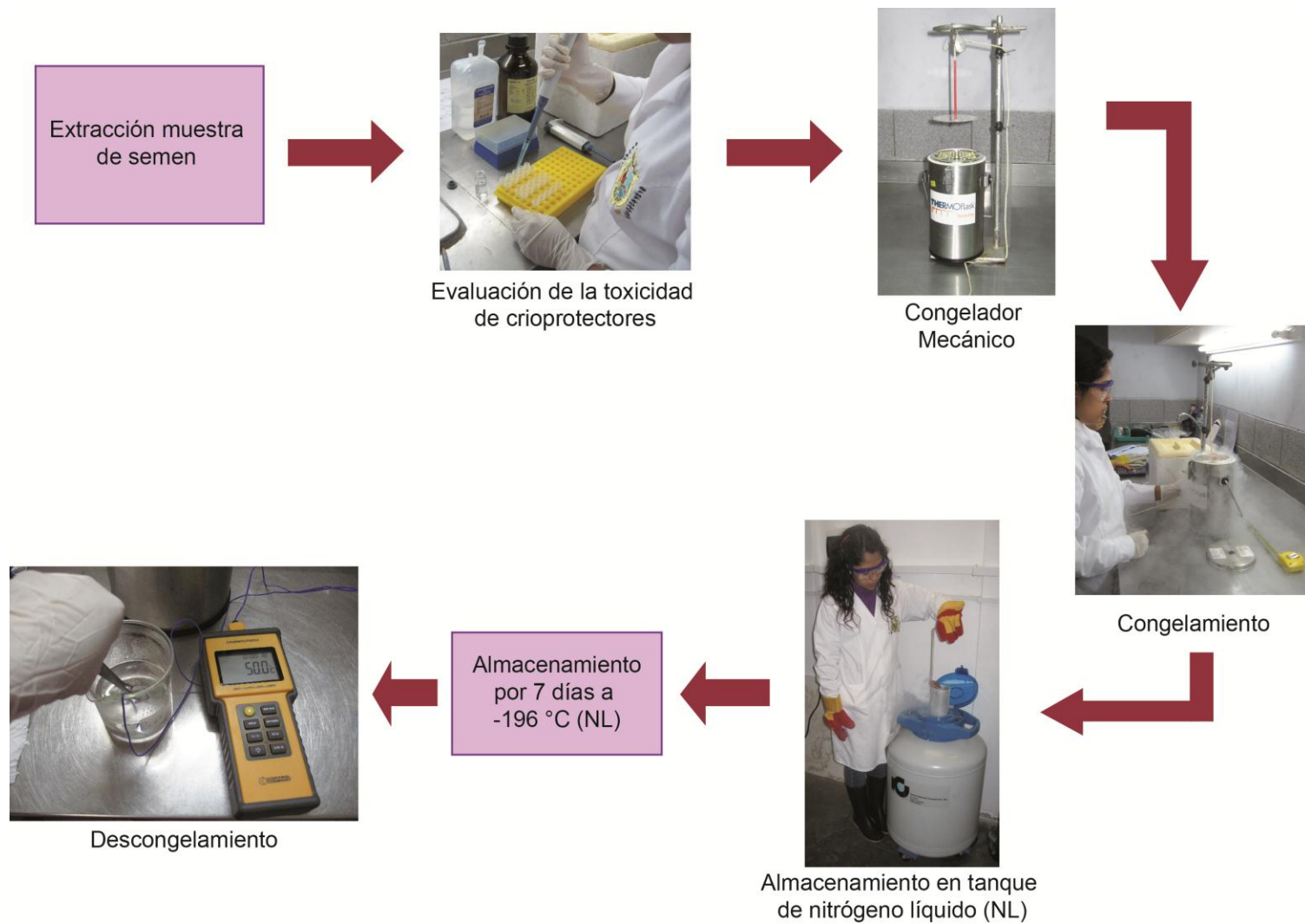


Figura 10. Criopreservación de espermatozoides.

#### **4.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos de la evaluación de la calidad espermática y criopreservación se expresaron en promedio  $\pm$  error estándar (ES). La normalidad de los datos se evaluó utilizando el test de Shapiro-Wilk, cuando fue necesario se aplicó la transformación de logaritmo en base 10 o arcoseno según la naturaleza de los datos y la homogeneidad de varianzas se determinó aplicando el test de Levene.

Para hallar las diferencias significativas entre individuos (calidad espermática) o tratamientos (toxicidad de crioprotectores), se utilizó Análisis de Varianza (ANDEVA) y el test de Tukey, ya que los datos presentaron una distribución normal y homogeneidad de varianzas. En las pruebas de tasas de congelamiento y descongelamiento, cuyos datos no tuvieron una distribución normal se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas.

Adicionalmente, se determinó la correlación entre dos variables, tiempo post-activación y motilidad espermática, y peso total del individuo y volumen espermático, mediante la Correlación de Pearson ya que estos datos fueron normales.

Para hallar las diferencias entre las dos técnicas de tinción que determinan la viabilidad espermática, se usó la prueba T-student con la corrección de Welch, porque los datos no tuvieron una homogeneidad de varianzas.

Se consideró un nivel de significancia de 0,05 para todas las pruebas estadísticas aplicadas. La data se procesó con el paquete estadístico-matemático R 2.12.2 para Windows.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

#### 5.1.1. Evaluación del volumen espermático

Se determinó evaluando el volumen total extraído de una muestra de semen por individuo. El volumen mínimo obtenido fue 300  $\mu\text{L}$  y el máximo 1200  $\mu\text{L}$ , con un promedio de  $758 \pm 310$   $\mu\text{L}$  ( $n=9$ ). Además se determinó que no existe correlación entre el volumen espermático producido con el peso total del individuo (Correlación Pearson,  $r=0.5461$ ,  $p>0.05$ ) (Figura 11).

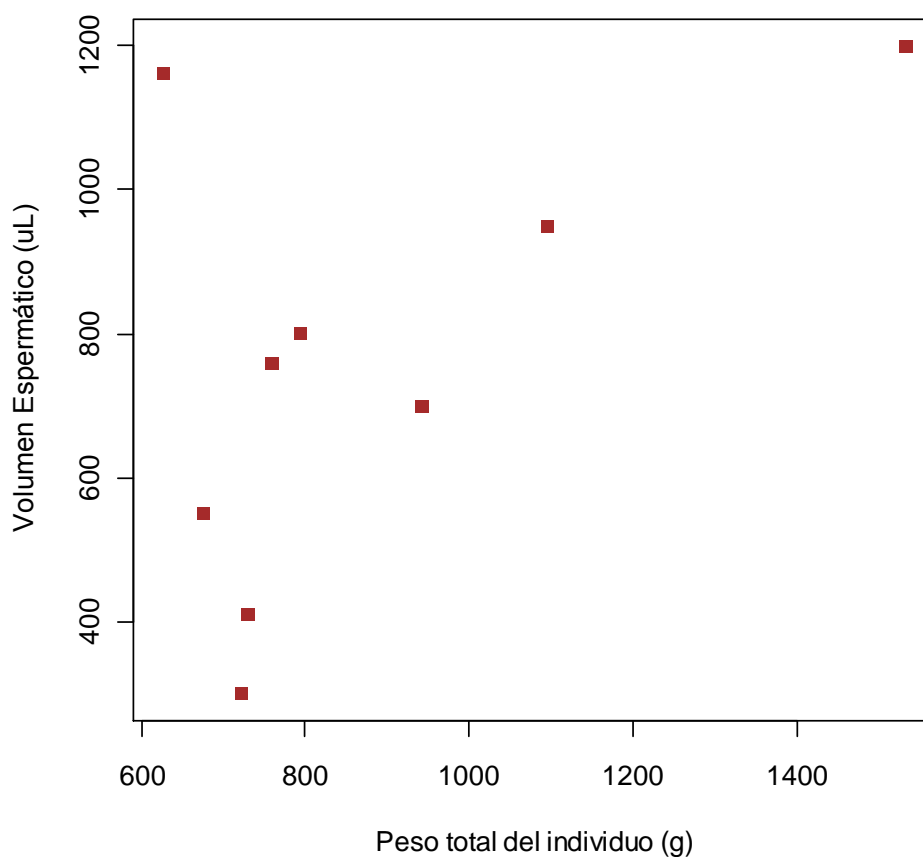


Figura 11. Correlación del volumen espermático y el peso total del individuo.

### 5.1.2. Evaluación de la concentración espermática

Se evaluó la concentración espermática de 11 individuos sin encontrarse diferencias significativas entre cada uno de ellos (ANDEVA,  $p > 0.05$ ). La concentración espermática mínima registrada fue  $0.61 \times 10^{10}$  espermatozoides/mL, mientras que el valor máximo fue  $8.42 \times 10^{10}$  de espermatozoides/mL. El promedio de la concentración espermática fue  $2.49 \pm 0.26 \times 10^{10}$  espermatozoides/mL ( $n=11$ ) (Figura 12).

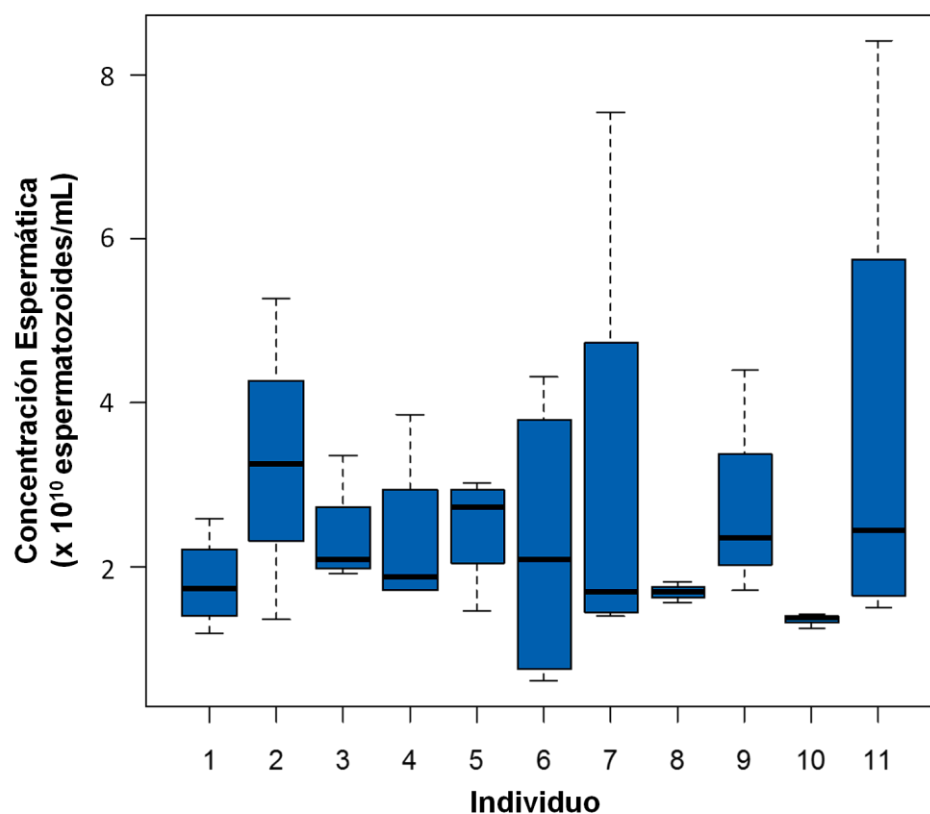


Figura 12. Diagrama de cajas de la concentración espermática ( $n=11$ ).

### 5.1.3. Evaluación de la motilidad espermática

La motilidad espermática resultó variable entre los individuos, sin embargo no se hallaron diferencias significativas entre ellos (ANDEVA,  $p>0.05$ ) (Figura X). Del grupo evaluado el valor promedio de la clase de motilidad fue  $4.00 \pm 0.26$ , aunque esta varió entre las clases 3 y 4. En tal sentido el porcentaje de motilidad espermática varió entre el 50 y 90 % de acuerdo a la escala de motilidad usada en este estudio (Figura 13).

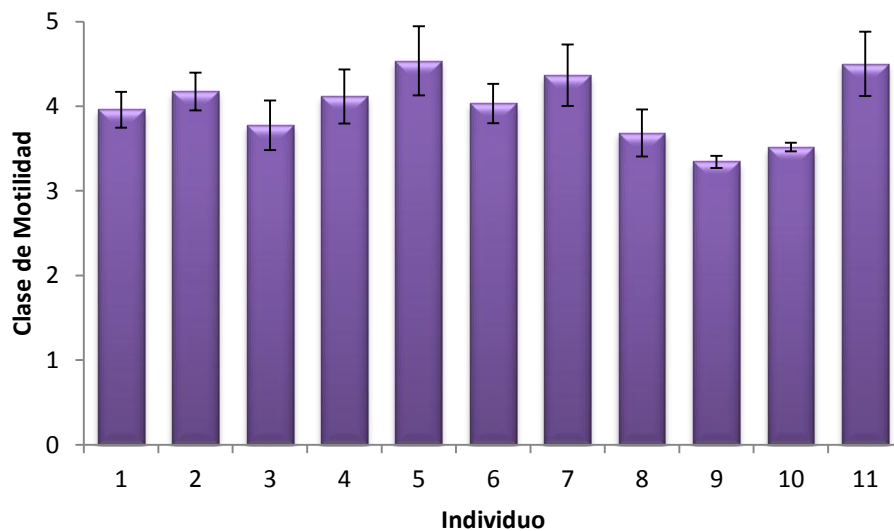


Figura 13. Evaluación de la motilidad espermática ( $n=11$ ).

La motilidad espermática se evaluó durante un periodo de 4 minutos luego de la activación del espermatozoide, donde el promedio de la motilidad en fresco a los 0 minutos post-activación fue de  $72.90 \pm 3.53$  % ubicándolo en la clase 3. A los 4 minutos post-activación el promedio de motilidad disminuyó hasta un promedio de  $14.8 \pm 3.47$  % que pertenece a la clase 1 de motilidad. Los resultados mostraron que existe una correlación negativa entre las variables (Coeficiente de correlación de Pearson,  $r=-0.989$ ,  $p<0.05$ ), es decir a mayor tiempo post-activación en AMFE, hay una disminución de la motilidad espermática (Figura 14).

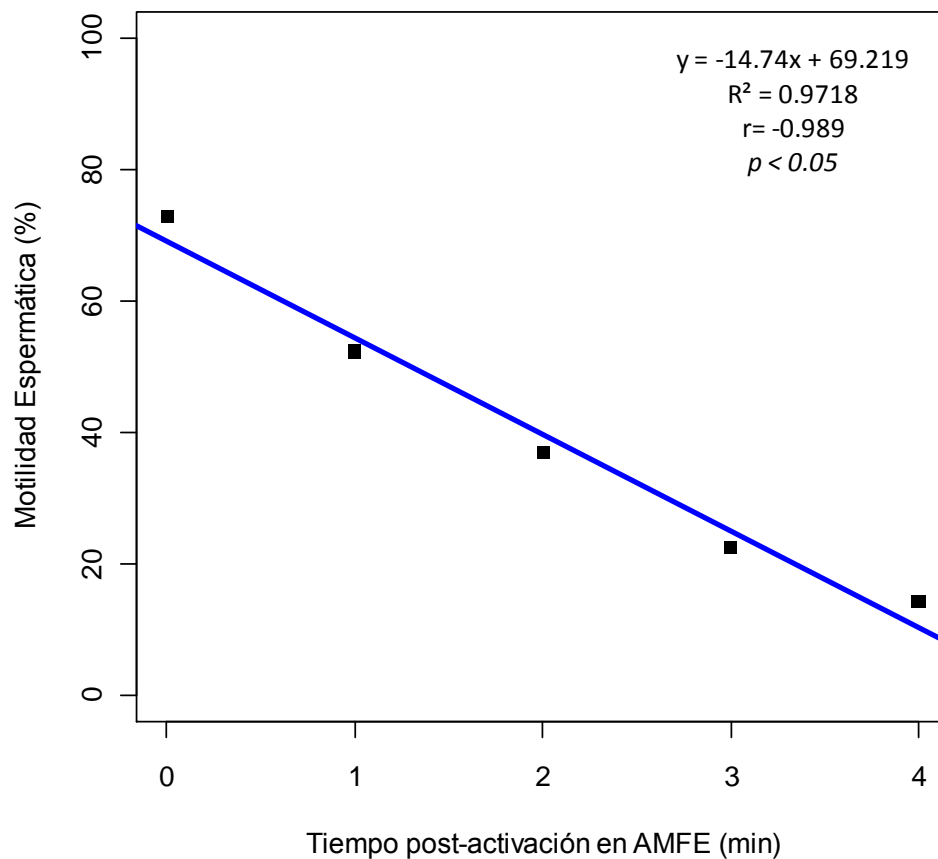


Figura 14. Correlación de la motilidad espermática y el tiempo post-activación en AMFE.

#### 5.1.4. Evaluación de la viabilidad espermática

La viabilidad espermática con la técnica de tinción Eosina-Nigrosina (Eo-Nig) varió entre el 97 y 99 % de viabilidad, sin encontrarse diferencias significativas entre los individuos (ANDEVA,  $p > 0.05$ ) (Tabla 1). Por otro lado, cuando se utilizó el kit de viabilidad LIVE/DEAD (SYBR 14 y Yoduro de Propidio (IP)) se halló que los porcentajes de viabilidad espermática variaron entre el 68 y 98 %. Además se hallaron diferencias significativas entre los individuos (ANDEVA,  $p < 0.05$ ), mostrando un individuo (N° 4) con mayor porcentaje de células viables en relación a otros individuos (N° 7, 10, 11) (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de viabilidad espermática mediante dos técnicas de tinción.

Individuo	Viabilidad Espermática (%) (Promedio $\pm$ ES)	
	Eo-Nig	SYBR-IP
1	98.62 $\pm$ 1.17	90.06 $\pm$ 0.89 <sup>ac</sup>
2	99.19 $\pm$ 0.16	98.68 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>
3	98.18 $\pm$ 0.92	94.40 $\pm$ 2.95 <sup>ac</sup>
4	99.01 $\pm$ 0.01	99.35 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
5	97.70 $\pm$ 0.17	94.15 $\pm$ 0.68 <sup>ac</sup>
6	99.35 $\pm$ 0.16	84.70 $\pm$ 6.78 <sup>ad</sup>
7	99.50 $\pm$ 0.29	69.00 $\pm$ 4.56 <sup>bd</sup>
8	97.35 $\pm$ 2.19	81.91 $\pm$ 2.87 <sup>bcd</sup>
9	97.56 $\pm$ 1.29	98.71 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>
10	96.67 $\pm$ 1.64	68.48 $\pm$ 3.79 <sup>bd</sup>
11	98.35 $\pm$ 0.45	73.50 $\pm$ 2.88 <sup>d</sup>

Las diferencias significativas detectadas por ANDEVA ( $p < 0.05$ ), están marcadas con letras diferentes en la columna SYBR-IP.

En ambas técnicas se evaluó la viabilidad espermática en relación a la integridad de la membrana plasmática, por lo tanto se realizó una prueba comparativa entre ellas para determinar si existen diferencias. Con la técnica de tinción con Eo-Nig el promedio fue de  $98.31 \pm 0.26 \%$  ( $n=11$ ), mientras que con el kit LIVE/DEAD (SyBr-IP) en promedio fue de  $87.67 \pm 8.28 \%$  ( $n=11$ ). Se aplicó la Prueba T-student con la corrección de Welch determinando que existen diferencias significativas entre ambas técnicas ( $p < 0.05$ ) (Figura 15).



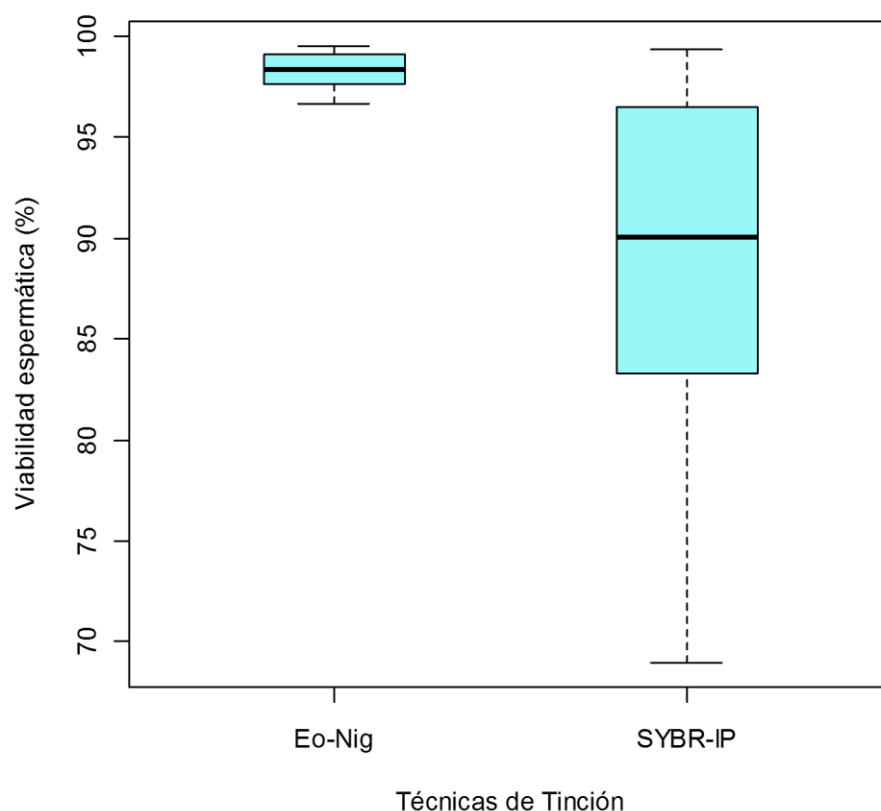


Figura 15. Diagrama de cajas de viabilidad espermática.  
Eo-Nig: Tinción Eosina-Nigrosina y SYBR-IP: Kit de Viabilidad Espermática LIVE/DEAD.

## 5.2. DETERMINACIÓN DEL CRIOPROTECTOR Y SU CONCENTRACIÓN ÓPTIMA

La evaluación de motilidad espermática se realizó hasta el minuto 4 post-activación. Se determinaron solo las diferencias, entre cada crioprotector a las concentraciones 1, 1.5 y 2 M, a 0, 1 y 2 minutos post-activación. A los 3 y 4 minutos, los resultados se hallaron en la clase 1, y no se tomaron en cuenta en el análisis porque los porcentajes de motilidad fueron menores al 10 %.

- *Crioprotectores 1 M*

A los 0 minutos, los valores de motilidad espermática se encontraron en la clase 2 variando entre 30 y 40 %. Los mayores porcentajes de motilidad se obtuvieron con DMSO y PG ( $40.67 \pm 5.26$  % y  $42.73 \pm 7.62$  %, respectivamente), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ambos valores (ANDEVA,  $P > 0,05$ ). A 1 minuto, los mayores porcentajes de motilidad se obtuvieron con DMSO ( $30.53 \pm 5.37$  %) y PG ( $30.64 \pm 6.45$ ), aunque los valores para EG y GLY fueron menores ( $25.63 \pm 4.20$  % y  $19.32 \pm 2.48$  %, respectivamente), no se encontraron diferencias significativas entre los crioprotectores (ANDEVA,  $P > 0,05$ ). A los 2 minutos post-activación la motilidad espermática se encontró en la clase 1, con valores menores al 15 % y no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (ANDEVA,  $P > 0,05$ ) (Figura 16).

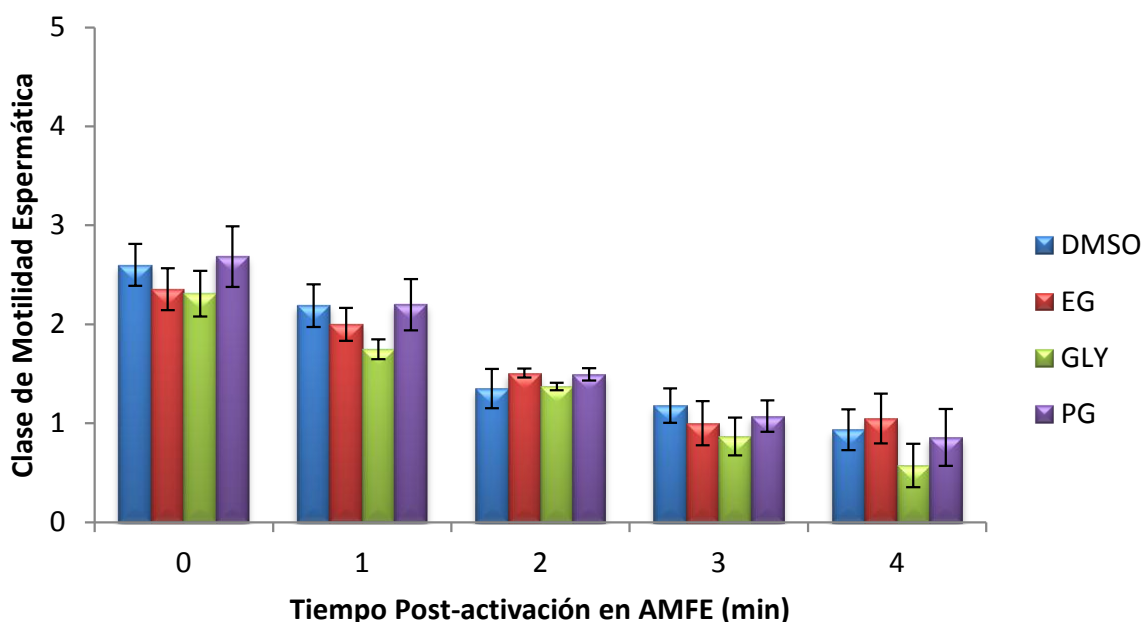


Figura 16. Motilidad espermática post-incubación en crioprotectores a concentración 1 M.

- *Crioprotectores 1.5 M*

La mayor motilidad espermática a los 0 minutos se obtuvo con DMSO (Clase  $3.04 \pm 0.23$ ,  $51.79 \pm 5.83$  %) pero no se hallaron diferencias significativas con EG y GLY pero si con PG que obtuvo el menor porcentaje (Clase  $2.02 \pm 0.18$ ,  $25.97 \pm 4.56$  %) (ANDEVA, Test de Tukey,  $P < 0,05$ ). A 1 minuto post-activación se halló una mayor motilidad espermática con DMSO (Clase  $2.35 \pm 0.23$ ,  $37.60 \pm 4.71$  %), pero no se hallaron diferencias significativas con los otros tres crioprotectores (ANDEVA,  $P > 0,05$ ). A los 2 minutos post-activación se halló una mayor motilidad espermática también con DMSO (Clase  $1.90 \pm 0.1$ ,  $23.12 \pm 2.51$  %) que fue significativamente diferente a los porcentajes obtenidos por GLY y PG, pero no a EG (ANDEVA, Test de Tukey,  $P < 0,05$ ) (Figura 17).

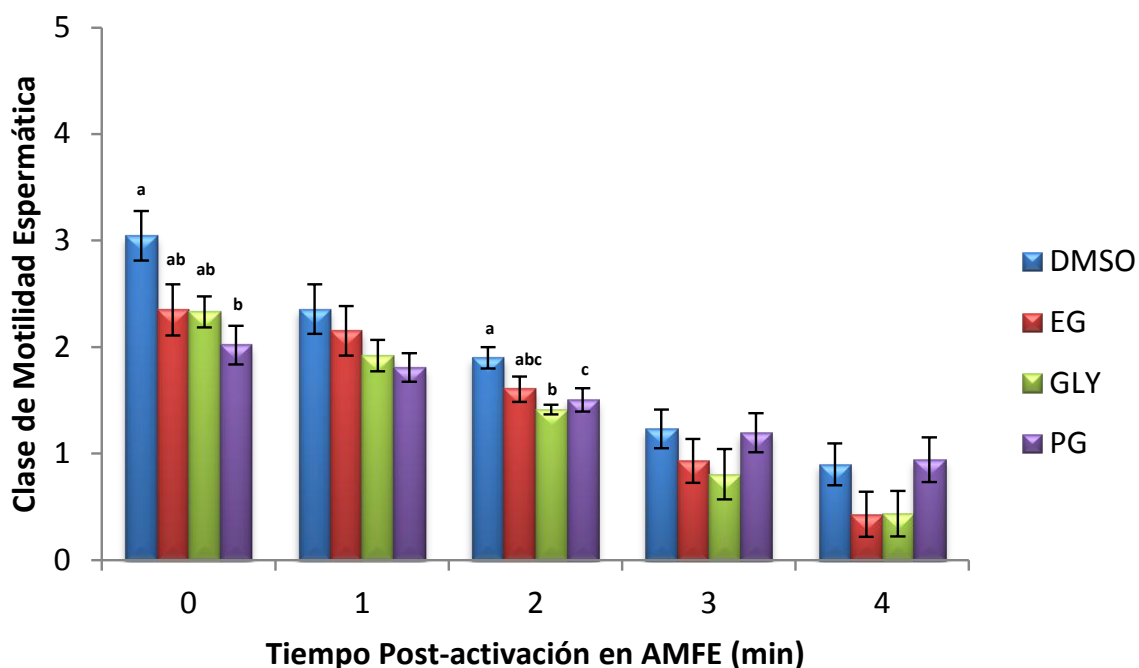


Figura 17. Motilidad espermática post-incubación en crioprotectores a concentración 1.5 M.

- *Crioprotectores 2 M*

La motilidad espermática en todos los tratamientos fue de la clase 2, y los porcentajes fueron menores al 40 %. A los 0 minutos el mayor porcentaje se obtuvo con DMSO (Clase  $2.39 \pm 0.11$ ,  $35.60 \pm 2.80$  %) sin encontrarse diferencias significativas con los otros crioprotectores (ANDEVA,  $P > 0,05$ ). A 1 minuto, el mayor porcentaje se obtuvo con PG (Clase  $1.98 \pm 0.17$ ,  $25.39 \pm 4.16$  %) y tampoco se hallaron diferencias significativas con los otros crioprotectores (ANDEVA,  $P > 0,05$ ). A los 2 min post activación se obtuvo mayor motilidad con PG (Clase  $1.65 \pm 0.09$ ,  $16.85 \pm 6.65$  %) que fue significativamente diferente a los resultados obtenidos con GLY (ANDEVA, Test de Tukey,  $P < 0,05$ ) (Figura 18).

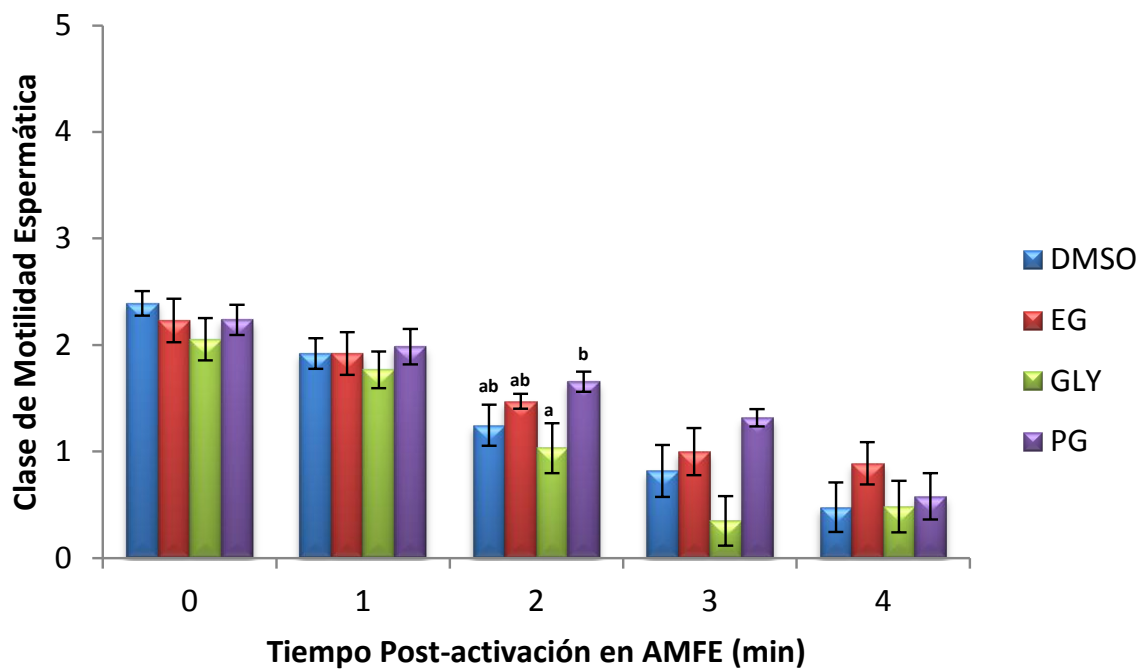


Figura 18. Motilidad espermática post-incubación en crioprotectores a concentración 2 M.

### 5.3. DETERMINAR LA TASA DE CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO

#### 5.3.1. Evaluar la condición espermática post-congelamiento

De los resultados de la evaluación de motilidad espermática post-incubación en soluciones crioprotectoras, se deduce que el crioprotector que ocasionó un menor efecto sobre la motilidad espermática fue DMSO 1.5 M, por lo tanto esta concentración fue utilizada para realizar las pruebas de congelamiento y descongelamiento.

La motilidad espermática estuvo entre las clases 0 y 1, variando entre un 0 y 12 % en todas las tasas de congelamiento y descongelamiento. Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ya que los datos no tuvieron una distribución normal. Cuando se evaluaron los porcentajes de motilidad espermática luego de aplicar la tasa de descongelamiento 1 (TD1), se hallaron diferencias significativas entre las 5 tasas de congelamiento ( $K=27.36$ ,  $p>0,05$ ) siendo la tasa  $-15$  °C/min la que obtuvo el mayor porcentaje ( $12.09 \pm 2.27$  %). Por otro lado, cuando se evaluó los porcentajes con la tasa de descongelamiento 2 (TD2), no se hallaron diferencias significativas ( $K=3.71$ ,  $p >0,05$ ) entre los resultados obtenidos con las 5 tasas de congelamiento (Figura 19).

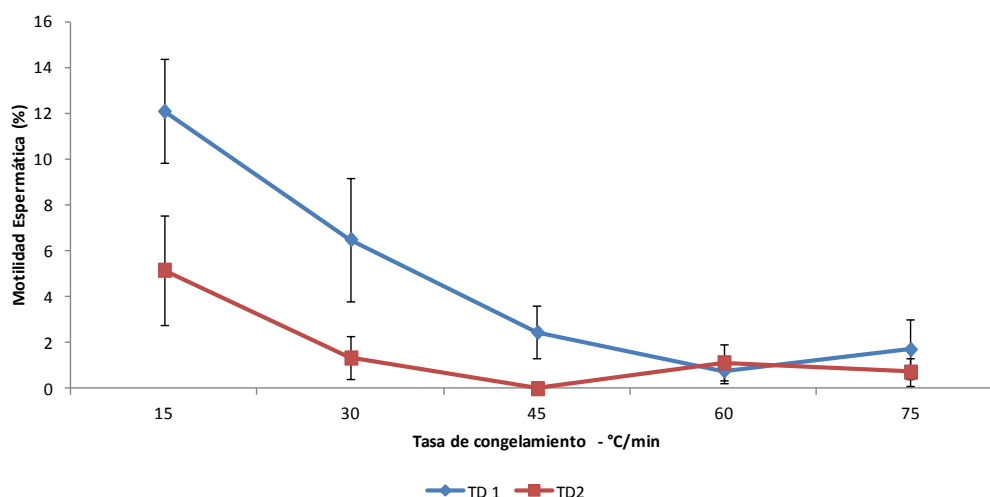


Figura 19. Evaluación de tasas de congelamiento y descongelamiento.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

La calidad espermática ha sido revisada por diversos autores (Billard *et al.*, 1995; Rurangwa *et al.*, 2004; Bobe y Labbé, 2010), definiéndola, desde un punto de vista biológico, como la habilidad que tiene el espermatozoide para fecundar exitosamente y subsecuentemente desarrollar un embrión normal. Dicha habilidad está regida por parámetros que permiten predecir y determinar el grado de calidad del gameto (Martínez y Pardo, 2010).

La calidad espermática es esencial cuando se quiere aumentar la eficiencia de la fecundación artificial (Hajirezaee *et al.*, 2010). El conocimiento de las diferentes características fisiológicas de los espermatozoides no solo permite mejorar los protocolos de inseminación sino mejorar el manejo de los gametos incluyendo los protocolos de su manipulación y almacenamiento (Suquet *et al.*, 1994). Además, el control de la calidad del esperma es importante en la selección de reproductores machos y proporciona información sobre problemas en los espermatozoides (Beirão *et al.*, 2009).

Los parámetros como volumen, concentración, motilidad y viabilidad espermática son los que determinan la calidad del esperma de los reproductores. Estos parámetros son variables entre las especies y pueden deberse a diferentes factores como condiciones de cultivo, temporada reproductiva, alimentación, inducción hormonal, entre otros (Hajirezaee *et al.*, 2010).

El volumen espermático de *P. adspersus* fue bajo, entre 300 y 1200  $\mu\text{L}$ , durante la etapa de experimentación, aunque mayor a lo reportado para la misma especie por Ángeles y Dupré (2002) donde obtuvieron un rango entre 100 y 800  $\mu\text{L}$  de esperma. La baja producción de esperma una característica común entre peces planos (Zohar y Mylonas,

2001) y en relación a otros pleuronectiformes los resultados obtenidos son similares, entre ellos: *Scophthalmus maximus* cuya producción varía entre 200 y 2200  $\mu\text{L}$  (Suquet *et al.*, 1994), *Paralichthys olivaceus* 400 y 1600  $\mu\text{L}$  (Zhang *et al.*, 2003) y *Paralichthys orbignyanus* en promedio  $250 \pm 71 \mu\text{L}$  (Ceccon *et al.*, 2010), sin embargo en *Solea senegalensis* la producción de esperma es menor a 80  $\mu\text{L}$  (Cabrita *et al.*, 2006).

El volumen espermático es variable y puede deberse a factores como la época reproductiva o la inducción hormonal. En peces planos como *S. senegalensis*, la producción de semen es variable en función de la época de evaluación, registrándose mayores volúmenes de semen coincidentes al periodo reproductivo de la hembras (Cabrita *et al.*, 2006). Así mismo en *P. orbignyanus* se registró que durante la época reproductiva el volumen de semen tiende a incrementarse desde el inicio hacia el final de la temporada (Ceccon *et al.*, 2010). Sin embargo en *P. adspersus* no se han realizado investigaciones sobre las variaciones de la calidad de semen durante la época reproductiva y no reproductiva.

La inducción hormonal también puede incrementar el volumen espermático debido a su efecto en la actividad de la gonadotropina tal como lo registraron Sorbera *et al.* (1996) en *Dicentrarchus labrax*. Lim y Kim (2007) demostraron en *Platichthys stellatus* que la inducción incrementa el volumen, sugiriendo que el mecanismo principal es el efecto de las hormonas sobre la hidratación de los ductos eferentes. Garber *et al.* (2009), en el trabajo sobre inducción para la espermiación en *Gadus morhua*, mencionan que el efecto que tiene la hormona sobre la calidad espermática puede variar de acuerdo a la especie, dosis, método de administración y tiempo post-inducción.

Por otro lado, en *P. adspersus* no se observó correlación significativa entre el volumen de esperma y el peso total del individuo, de modo similar a lo registrado en ejemplares de

*Scophthalmus maximus* de 1.4 a 3.2 kg (Suquet, 1992). En otras especies de peces planos como *Limanda yokohamae*, *Limanda herzensteini*, *P. stellatus* y *P. olivaceus*, dicha relación también ha sido observada, obteniendo valores de volumen espermático en mililitros  $1.7 \pm 1.5$ ,  $0.5 \pm 0.4$ ,  $0.4 \pm 0.2$  y  $0.4 \pm 0.3$  respectivamente, por cada 100 g de peso total del pez (Chang y Chang, 2002).

Con respecto a la concentración espermática, para *P. adspersus* fue  $2.49 \pm 0.26 \times 10^{10}$  espermatozoides/mL, lo que supera a lo reportado por Ángeles y Dupré (2002) para esta especie ( $7.43 \pm 2.51 \times 10^9$  esp/mL). Esta diferencia puede deberse a que los peces utilizados en nuestro experimento fueron inducidos hormonalmente con LH-RH previo a la obtención de muestras, por lo que se hace necesario realizar estudios dentro y fuera de la época reproductiva y además ver el efecto de la hormona sobre el volumen y la concentración espermática.

El valor obtenido para *P. adspersus* estuvo dentro del rango de valores reportados para otros peces marinos (Suquet *et al.*, 1994) y similares a lo reportado en otros peces planos como *Limanda yokohamae* con  $3.60 \pm 1.35 \times 10^{10}$ , *Limanda herzensteini* con  $1.47 \pm 0.57 \times 10^{10}$  (Chang y Chang, 2002), *Paralichthys olivaceus* con  $0.5 - 1.5 \times 10^{10}$  (Zhang *et al.*, 2003) y *Paralichthys orbignyanus* con  $0.8 - 1.2 \times 10^{10}$  (Ceccon *et al.*, 2010). Por otro lado fue superior a los valores registrados en *Scophthalmus maximus*  $0.7 - 11 \times 10^9$  esp/ mL (Suquet *et al.*, 1994), *Platichthys stellatus*  $8.7 \pm 3.3 \times 10^9$  (Chang y Chang, 2002) y *Solea senegalensis*  $0.7 - 2 \times 10^9$  (Cabrita *et al.*, 2006).

Al igual que el volumen, la concentración también se ve afectada por diversos factores como la procedencia de los ejemplares, es decir existen diferencias entre un stock de reproductores provenientes del medio natural que los nacidos en cautiverio, donde los primeros tienen mayores concentraciones durante algunos periodos (Cabrita *et al.*, 2006).



Las variaciones en la concentración espermática de acuerdo a la temporada reproductiva también es factor determinante en algunas especies, por ejemplo en *P. orbignyanus* se registró un decrecimiento de la densidad durante la etapa media del periodo reproductivo (Ceccon *et al.*, 2010). Por el contrario, en otras especies de peces marinos *Pagrus pagrus* no se observan tales variaciones en la concentración durante el periodo reproductivo sugiriendo una densidad constante (Mylonas *et al.*, 2003).

La motilidad espermática es considerada como el factor principal relacionado con la calidad espermática. Sin embargo, este es el primer estudio sobre la motilidad espermática de *P. adspersus*, donde se encontró que la motilidad es de clase 3 y 4 con porcentajes entre 50 y 90 %. Los resultados son similares a los obtenidos por Ceccon *et al.* (2010), donde la motilidad espermática durante el periodo reproductivo de *P. orbignyanus* pertenece a la clase 3, es decir entre 50 y 70 % post-activación. En otros peces planos como *P. olivaceus* y *S. senegalensis* la motilidad espermática varía entre 75-95 % y 40 a 90 % post-activación, respectivamente (Zhang *et al.*, 2003 y Cabrita *et al.*, 2006).

Los espermatozoides se encuentran inmóviles en el plasma seminal (Hoang *et al.*, 2010) y la activación de la motilidad en peces marinos se produce inmediatamente después del contacto con agua de mar, debido al cambio de osmolaridad hacia un medio hipertónico, por lo tanto el incremento de la osmolaridad es un factor importante para la activación de la motilidad espermática (Cosson *et al.*, 2008). Además, dicha activación también puede ser afectada por la tasa de dilución, la concentración de cationes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^+$ , pH, temperatura, (Hoang *et al.*, 2010), gases ( $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ ), cambios morfológicos o metales pesados (Valdebenito *et al.*, 2009).

La medición de la motilidad espermática es variable debido a la subjetividad de las técnicas aplicadas. La estimación subjetiva se ve afectada por diferentes factores como la experiencia del observador, los criterios de valor elegidos y cómo son interpretadas las medidas (Rurangwa *et al.*, 2004). En la presente tesis, se aplicó una evaluación subjetiva diferenciando la motilidad en clases según lo empleado por Ceccon *et al.* (2010) y calculando el porcentaje de motilidad en base al número de espermatozoides en movimiento y el total de espermatozoides evaluados por campo (Geffen y Frayer, 1993).

La motilidad espermática también está asociada con la etapa reproductiva, es decir durante dicho periodo la motilidad espermática también se incrementa (Cabrita *et al.*, 2006). Así mismo, en cada especie varían los factores que activan la motilidad espermática, como la duración y el patrón de actividad flagelar (Valdebenito *et al.*, 2009). Los tratamiento hormonales también influyen favorablemente en la motilidad espermática tal como sucedió en *Pleuronectes ferrugineus* (Clearwater y Crim, 1998), e *Hippoglossus hippoglossus* (Vermeirssen *et al.*, 2000).

Con respecto a la duración de la motilidad espermática de *P. adspersus*, se denota una disminución de esta con el incremento del tiempo post activación, llegando a los 4 minutos con un 10 % de espermatozoides móviles. La duración de la motilidad en peces planos es variable, tal es el caso de *Hippoglossus hippoglossus* con una duración máxima es de 2 minutos, *Scophthalmus maximus* y *L. yokohamae* con 10 minutos (Cosson *et al.*, 2008 y Kho *et al.*, 1997, respectivamente). La relación inversa observada entre la motilidad espermática de *P. adspersus* y tiempo, también ha sido registrada en otras especies marinas como *Thunnus thynnus* (Doi *et al.*, 1982). Dicha relación, se debe al consumo muy rápido de ATP intracelular ocasionado hiperactividad inicial luego de activación (Cosson *et al.*, 2008).

La viabilidad de los espermatozoides también permite inferir en la calidad espermática, refiriéndose a la integridad de la membrana (Rurangwa *et al.*, 2004). La evaluación de este parámetro permite la predicción de la fertilidad potencial en muestras de semen, ya que una membrana plasmática intacta es necesaria para la fecundación (Chalah y Brillard, 1998). La viabilidad de los espermatozoides es ampliamente utilizada para la evaluación de espermatozoides de mamíferos (Garner *et al.*, 1995 y BjoÈrndahl *et al.*, 2003) pero la prueba de la viabilidad de los espermatozoides en especies acuáticas se limita a unos pocos estudios. En *P. adspersus* es el primer reporte que se establece sobre viabilidad espermática mediante dos técnicas de tinción con Eosina-Nigrosina y Kit de viabilidad LIVE/DEAD® (SYBR14-Yoduro de Propidio).

La técnica de tinción con Eosina-Nigrosina ha sido ampliamente aplicada en espermatozoides de mamíferos como jabalíes, toros, conejos y carneros (BjoÈrndahl *et al.*, 2003) y en pocas especies acuáticas. Esta técnica depende de la habilidad y funcionalidad de las membranas, ya que esta al encontrarse intacta excluye el colorante eosina (Garner *et al.*, 1987). Además es una técnica de bajo costo y permite la evaluación tanto de la viabilidad y la morfología de los espermatozoides. Sin embargo, la fiabilidad de la técnica disminuye debido a que la población de espermatozoides analizada es relativamente pequeña (aproximadamente 200 espermatozoides) (Klimowicz *et al.*, 2012)

En *Lutjanus argentimaculatus*, especie marina, se evaluó la viabilidad espermática de espermatozoides criopreservados mediante la técnica eosina/nigrosina, obteniendo  $92.7 \pm 2.3$  % de viabilidad (Vuthiphandchai *et al.*, 2009). En *P. adspersus* el porcentaje de viabilidad de semen fresco evaluado con dicha técnica fue alto ( $98.31 \pm 0.26$  %) lo que indica que la estructura de la membrana celular se encuentra intacta, aunque no existen

registros que nos permitan comparar dichos valores, se entiende que el porcentaje óptimo de viabilidad son los valores cercanos al 100%.

Por otro lado, la técnica de tinción con colorantes fluorescentes SYBR 14 y yoduro de propidio (kit de viabilidad LIVE/DEAD®) ha sido aplicada en algunas especies acuáticas como *Crassostrea virginica* (Paniagua *et al.*, 2006), *Cyprinus carpio* (Jenkins y Goodbred, 2006) y *P. orbignyanus* (Ceccon *et al.*, 2008). El porcentaje de viabilidad obtenido en semen fresco de *P. adspersus* fue  $87.67 \pm 8.28$  %, mientras que en *P. orbignyanus*, especie marina, fue  $60 \pm 6$  % (Ceccon *et al.*, 2008) y en otras especies como *Cyprinus carpio*, especie de agua dulce, fue  $92.3 \pm 0.2\%$  (Jenkins y Goodbred, 2006).

En relación a los resultados obtenidos mediante otras técnicas de viabilidad, los valores de *P. adspersus* son más altos, en *Solea senegalensis* determinaron una viabilidad espermática entre 59-23 % mediante la técnica de Anexina-V (Beirão *et al.*, 2009). Por otro lado, en peces de agua dulce también se ha evaluado la viabilidad mostrando rangos comparables a los obtenidos en *P. adspersus*. Flajšhans *et al.* (2004) evaluaron la viabilidad espermática de *Acipenser baerii*, *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca* y *Silurus glanis* mediante la citometría de flujo y obtuvieron 83.56 - 94.59, 93.92 - 97.02, 76.14 - 97.76 y 79.45 - 83.76 % de viabilidad respectivamente, mientras que Nynca y Ciereszko, (2009) mediante NucleoCounter SP-100 obtuvo un rango de 79.9 - 84.9 % en espermatozoides de *Salvelinus fontinalis*.

Los porcentajes de viabilidad espermática, son variables entre las especies y según la técnica que se aplica para su determinación. En tal sentido, para espermatozoides de *P. adspersus* se halló una diferencia entre los resultados de viabilidad espermática entre la técnica con SYBR14-IP y la técnica con Eo-Nig, lo que puede deberse a la mayor sensibilidad que presente una de ellas. Aunque no se ha determinado que la técnica de

SYBR14-IP sea más sensible que Eo-Nig para espermatozoides de peces, otros autores que han realizado dicha comparación en espermatozoides de aves. Chalah y Brillard (1998) y Klimowicz *et al.* (2012) concluyeron que la asociación de doble procedimiento SYBR-14/PI es más eficaz (o, al menos, más rápida) que la tinción eosina / nigrosina siendo validado con espermatozoides frescos y criopreservados.

## **6.2. ENSAYOS EN CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES**

Un protocolo de criopreservación puede incrementar la disponibilidad de semen y facilitar la reproducción de lenguado, aunque dicho proceso puede ocasionar daños sobre las células y en caso de los espermatozoides tener un efecto negativo sobre la motilidad espermática, la cual puede verse afectada por dos tipos de daños a la mitocondria: un daño directo sobre el ADN o su membrana, y uno indirecto provocado por la fragmentación del ADN nuclear, del cual depende la mitocondria para obtener algunas proteínas que no codifica su genoma (Kurland y Andersson, 2000). Por lo tanto, la disminución en la motilidad se asocia principalmente con los daños en la mitocondria, reafirmando esta organela como núcleo energético del espermatozoide (Fraser y Strzezek, 2007) y de cuya disponibilidad de ATP depende la detención o prolongación de la motilidad (Dreanno *et al.*, 1999).

Los procesos de criopreservación son altamente variables, en la mayoría de los casos, son necesarios ajustes especie - específicos a los protocolos existentes. Las variaciones en los protocolos se dan en los diluyentes, crioprotectores, tasas de congelamiento y descongelamiento (Medina *et al.*, 2005)

El diluyente, tiene como finalidad extender el volumen e inhibir la motilidad espermática (Suquet *et al.*, 2000), en espermatozoides de *P. adspersus*, como diluyente se utilizó NaCl

0.9 % comprobando que no causa la activación espermática, uso que es corroborado en otras especies marinas, cuyos protocolos de criopreservación ya están establecidos, como *Epinephelus malabaricus* (Gwo *et al.*, 1993), *Thunnus orientalis* (Gwo *et al.*, 2005) y *Engraulis ringens* (Catcoparco *et al.*, 2010).

Las soluciones crioprotectoras pueden reducir el daño ocasionado por los procesos de congelamiento y descongelamiento (Bromage y Roberts, 1995), por lo tanto la elección de un eficaz crioprotector es determinante. Durante las pruebas de toxicidad, el DMSO a 1.5 M fue el crioprotector más eficiente, respecto al EG, GLY y PG; aunque se evidenció una reducción en la motilidad espermática post incubación, se logró obtener hasta el 51 % de motilidad espermática.

En otras especies de peces planos también se empleó DMSO como crioprotector a concentraciones similares, DMSO al 10 % en *S. maximus* (Chen *et al.*, 2004) y *P. stellatus* (Lim *et al.*, 2007), DMSO 1.4 M y sacarosa en *P. orbignyanus* (Ceccon *et al.*, 2008) y DMSO 13.3 % (~ 1.5 M) en *Verasper variegatus* (Tian *et al.*, 2008). No obstante, la toxicidad de este compuesto puede variar entre especies, siendo lesivo para algunas, por lo que se debe recurrir a otros crioprotectores que garanticen una mejor integridad de la motilidad espermática (Martínez y Pardo, 2010). El propilenglicol al 10 % resultó favorable para espermatozoides de *P. ferrigneus* (Richardson *et al.*, 1999) mientras que en *P. olivaceus* fue el glicerol al 12 % (Zhang *et al.*, 2003).

En peces marinos como *Micropogonias undulatus* (Gwo *et al.*, 1991), *Macrozoarces americanus* L. (Yao *et al.*, 2000), *T. orientalis* (Gwo *et al.*, 2005), *Gadus morhua*, *Melanogrammus aeglefinus* (Degraaf y Berlinsky, 2004), *Apostichopus japonicus* (Shao *et al.*, 2006) y *E. ringens* (Catcoparco *et al.*, 2010) también se empleó el DMSO como agente crioprotector. Suquet *et al.* (2000) sugieren que con dicho crioprotector se

obtienen mejores resultados. La eficacia del DMSO se debe a la rápida penetración en los espermatozoides y su acción con los fosfolípidos de la membrana espermática (Medina *et al.*, 2005).

Por otro lado, la dilución de la muestra de semen con el crioprotector es un factor que influye en los resultados de motilidad espermática. En el presente trabajo se empleó una dilución de 1:200 (semen: diluyente + crioprotector) obteniendo una motilidad post-congelamiento del 12 %, la alta dilución también ha sido empleada para la criopreservación de espermatozoides de *Engraulis ringens* (1:400) donde se obtuvieron porcentajes de motilidad post-congelamiento entre el 60 y 90% (Catcoparco *et al.*, 2010). En contraste con otras especies de peces planos, la criopreservación se lleva a cabo en muestras más concentradas como en *Scophthalmus maximus* y *P. orbignyanus* donde se emplea una dilución 1:3 (semen: diluyente + crioprotector) obteniéndose porcentajes motilidad del 78 y >50 %, respectivamente (Chen *et al.*, 2004, Ceccon *et al.*, 2008).

Las tasas de congelamiento y de descongelamiento son parámetros muy sensibles y críticos, ya que la combinación de tiempos y temperaturas, pueden ayudar a disminuir el efecto de la cristalización. El rango de temperaturas en ambas tasas es muy amplio (Medina *et al.*, 2005). Durante las pruebas de congelamiento utilizando DMSO 1.5 M como crioprotector, se determinó que a una tasa de congelamiento de -15°C/ min y de -50 °C/ min de descongelamiento el porcentaje de motilidad espermática fue del 12 %, aunque dicho porcentaje fue reducido, la tasa de congelamiento fue igual a la utilizada por Ángeles y Dupré (2002) en la misma especie *P. adspersus*. Cabe resaltar que dicho autores evaluaron los efectos de criopreservación sobre la morfología del espermatozoide y no sobre la motilidad espermática.

Las tasas de congelamiento evaluadas -15, -30, -45, -60, -75 °C/ min se encuentran dentro de las utilizadas por otros autores. En tal sentido, Gwo *et al.* (1991) en *Micropogonias undulatus* evaluaron tasas desde -10 °C/min a -150 °C/min, resultando la mejor tasa a -12 °C/min, en *Morone saxatilis* se evaluó tasas de -10 °C/min a -40 °C/min, obteniendo mejores resultados con esta última (He y Woods, 2004). En peces planos como *Pleuronectes ferrugineus*, Richardson *et al.* (1999) evaluaron tasas de -7 °C/min a -20 °C/min y determinaron la mejor tasa a -19.58 °C/min. Chen *et al.* (2004) diseñaron la curva de congelamiento para *Scophthalmus maximus* donde probaron dos tasas de congelamiento -18.6 y -31.0 °C/min, la cual ha sido aplicada en otras especies de peces planos con resultados similares al de semen en fresco (Ceccon *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2008).

La tasa de descongelamiento utilizada fue de 50°C/ min, que es una tasa rápida. Las tasas rápidas se aplican con la finalidad de disminuir el efecto de la recrystalización del esperma (Medina *et al.*, 2005). Por otro lado, Ángeles y Dupré (2002), aplicaron otras tasas siendo la velocidad de 633 y 678 °C/ min. Otros autores Chen *et al.* (2004) aplicaron una tasa de descongelamiento de 37 °C/min para espermatozoides de *Scophthalmus maximus*, Richardson *et al.* (1999) en *Pleuronectes ferrugineus* 120 °C/ min y Zhang *et al.* (2003) en *P. olivaceus* 28 °C hasta que descongele.

Finalmente, la condición espermática se ve afectada negativamente por la criopreservación, sin embargo es necesario obtener valores aceptables de motilidad que permitan la fecundación. Existen protocolos ya establecidos en diferentes especies marinas, donde la motilidad espermática se considera aceptable, dichos protocolos son variables en crioprotectores, tasas de congelamiento y descongelamiento.



Tal es el caso de especies marinas como *Gadus morhua* que empleó DMSO al 10 %, con una tasa de congelamiento y descongelamiento de - 15 °C/min y 20 °C por 30 s respectivamente, obteniendo una motilidad del  $66 \pm 2.1$  % (Degraaf y Berlinsky, 2004), *Thunnus orientales* utilizó DMSO al 20 %, el congelamiento se realizó sobre la superficie del nitrógeno líquido por 10 minutos para luego sumergir las muestras completamente y el descongelamiento fue de 20 °C por 10 s obteniendo un  $84.3 \pm 5.7$  a  $93.3 \pm 8.2$  % (Gwo *et al.*, 2005).

En caso de otros peces planos, *P. olivaceus* empleó GLY al 12 %, el congelamiento fue de - 15 a - 160 °C y un descongelamiento a 28 °C hasta q descongele, obteniendo una motilidad del  $79.17 \pm 4.5$  % (Zhang *et al.*, 2003), en *Scophthalmus maximus* se utilizó DMSO al 10 %, a una tasa de congelamiento de - 18.6 °C/min y de descongelamiento de 37 °C por un minuto obteniendo  $78.3 \pm 7.6$  % (Chen *et al.*, 2004) y *P. orbignyanus* con DMSO 1.4 M con un congelamiento a 6 cm de la superficie del nitrógeno líquido por 10 min para luego sumergir las muestras completamente y un descongelamiento de 37 °C por 30 s obteniendo  $60 \pm 6$  % (Ceccon *et al.*, 2008).

Es importante señalar que en nuestros datos no publicados (IMARPE) sobre criopreservación de *P. asdpersus*, se obtuvieron mejores resultados de motilidad espermática post-congelamiento. El protocolo empleado se basó en los mejores resultados obtenidos por la presente tesis, pero se realizaron con muestras a menores diluciones en cuanto al crioprotector y el semen.

## 7. CONCLUSIONES

- Los parámetros considerados para evaluar la calidad espermática de *P. adspersus* son los mismos que se utilizan en otras especies de peces planos y cuyos resultados fueron bastante similares.
- De los cuatro crioprotectores utilizados, el DMSO (1.5 M) fue con el que se obtuvo un mayor porcentaje de motilidad espermática post-incubación, resultando el crioprotector menos tóxico para ser utilizada en la criopreservación.
- Se determinó que a una tasa de congelamiento de  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , la motilidad espermática post-congelamiento es mayor en comparación a tasas mayores.
- Posterior al congelamiento y a una tasa descongelamiento de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , la condición espermática (% motilidad) fue baja, por lo que se plantea que dichos resultados pueden ser mejorados optimizando los procesos y técnicas para la criopreservación.

## 8. RECOMENDACIONES

- Evaluar la calidad espermática de *P. adspersus*, sin inducción hormonal.
- Evaluar si existen variaciones en la calidad espermática de *P. adspersus*, durante la época reproductiva y no reproductiva.
- Evaluar el efecto de la dilución de las muestras de semen con el crioprotector y el diluyente, sobre la motilidad espermática post-congelamiento con la finalidad de incrementar la motilidad post-congelamiento.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, E. y L. Cid. 1995. On the ecology of two sympatric flounders of the genus *Paralichthys* in the Bay of Coquimbo, Chile. *Netherlands Journal of Sea Research*, 34: 7-18.
- Alavi S.M.H. y J. Cosson. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30: 1-14.
- Alavi S.M.H., O. Linhart, K. Coward y M. Rodina. 2007. Fish spermatology: Implications for aquaculture management. In: Alavi S.M.H., Cosson J., Coward K., Raffie G. (edit.). *Fish spermatology*. Alpha Science Intl Ltd, Oxford, UK, 397- 460.
- Alavi S.M.H., M. Rodina, A. Hatef, V. Stejskal, T. Policar, J. Hamačková y O. Linhart. 2010. Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae).
- Alvial, A. y J. Manríquez. 1999. Diversification of flatfish culture in Chile. *Aquaculture*, 176: 65-73.
- Angeles B. y E. Dupré. 2002. Efecto del proceso de criopreservación sobre algunas características morfológicas del espermatozoide de lenguado *Paralichthys adspersus*. En: *Primer congreso nacional de acuicultura*.
- Angeles, B. y J. Mendo. 2005. Crecimiento, fecundidad y diferenciación sexual del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindachner) de la costa central del Perú. *Ecología Aplicada*, 4: 1-2.
- Anguis, V. y J.P. Cañavate. 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture*, 243: 133-145.
- Babiak I., O. Ottesen , G. Rudolfson y S. Johnsen. 2006. Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology*, 65: 1587-1604.

- Beirão J., F. Soares, M.P. Herráez, M.T. Dinis y E. Cabrita. 2009. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level. *Theriogenology*, 72: 1251-1261.
- Billard R, J. Cosson, L.W. Crim y M. Suquet. 1995. Sperm physiology and quality. In: Bromage N.R. y R.J. Roberts (edit.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Oxford: Blackwell, 25–52.
- Billard R., 1992. Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100: 263 - 298.
- Blaxter J.H.S. 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172: 1189–90.
- Bobe J. y C. Labbé. 2010. Egg and sperm quality in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165 (3): 535 - 548.
- Bolla S, I. Holmefjord y T. Refstie. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. *Aquaculture*, 65: 371–4.
- Borges A., D.R.Siqueira, D.F.Jurinitz, R.Zanini, F.Amaral, M.L.Grillo, E.R. Oberst y G.F. Wassermann. 2005. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 31: 45-53.
- Bromage, N.R. y R.J. Roberts. 1995. *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, Oxford, UK. 424 pp.
- Buyukhatipoglu, S. y W. Holtz. 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*, 37: 63– 71.
- Cabrita E., V. Robles, S. Cuñado, J.C. Wallace, C. Sarasquete y M.P. Herráez. 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology*, 50(3): 273-284.

- Cabrita E., F. Soares y M.T. Dinis. 2006. Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture*, 261: 967-975.
- Cabrita E, V. Robles y P. Herráez. 2008. Sperm quality assessment. In: Cabrita E., Robles V., Herráez M.P. (edit.). *Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species*. London, UK: CRC Press (Taylor and Francis group), p. 93–147.
- Cabrita E., F. Soares, J. Beirão, A. García-López, G. Martínez-Rodríguez y M.T. Dinis. 2011. Endocrine and milt response of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, males maintained in captivity. *Theriogenology*, 75(1): 1-9.
- Catcoparco C., E. Dupré y C. Espinoza. 2010. Criopreservación de espermatozoides de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(1): 121-126.
- Ceccon, C., M. Okamoto, P. Varoni, T. Collares, V. Farias, J. Deschamps, R. Berteaux, L. Marins y L. Sampaio. 2008. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, 275: 361–365.
- Ceccon C., M. Hideo, H. Bianchini, L. Marins y L. Sampaio. 2010. Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. *Aquaculture Research*, 1-9.
- Challah T. y J.P. Brillard. 1998. Comparison of assessment of fowl sperm viability by Eosin-Nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology*, 50:487–93.
- Chen, S.-L., X.-S.Jia, G.-C.Yua, Y.-S. Tiana y Z.-X. Sha. 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*, 236: 547–556.
- Clearwater S.J. y L.W. Crim (1998) Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility, seminal plasma pH and sperm production in yellowtail founder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 19: 349-357.

- Cloud J.G. y S.J. Patton. 2008. Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. In: Cabrita E., Robles V., Herráez M.P. (edit.). *Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species*. London, UK: CRC Press (Taylor and Francis group), p. 237-250.
- Cosson J., A. Groison, M. Suquet, C. Fauvel, C. Dreanno y R. Billard. 2008. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction*, 136: 277-294.
- DeGraaf J.D. y D.L. Berlinsky. 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquaculture*, 234: 527–540.
- Doi M., T. Hoshino, Y. Taki y Y. Ogasawara. 1982. Activity of the sperm of the bluefin tuna *Thunnus thynnus* under fresh and preserved conditions. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48(4): 495-498.
- Dreanno C., M. Suquet, E. Destruyeres, J. Cosson, H. Le Delliou y R. Billard. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 169: 247-262.
- Dreanno C., F. Seguin, J. Cosson, M. Suquet y R. Billard. 1999. Metabolism of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa: relationship between motility, intracellular nucleotide content, mitochondrial respiration. *Mol. Reprod. Dev.*, 53: 230-243.
- Dupré, E. y C. Espinoza. 2004. Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico. *Investigaciones Marinas, Valparaíso*, 32(2): 3-9.
- Espinoza C., M. Valdivia y E. Dupré. 2010. Morphological alterations in cryopreserved spermatozoa of scallop *Argopecten purpuratus*. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(1): 121-128.
- FAO. 2006. State of world aquaculture 2006.
- FAO. 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010.
- Fauvel C., M. Suquet y J. Cosson. 2010. Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 636–643.

- Flajšhands M., J. Cosson, M. Rodina y O. Linhart. 2004. The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biology International*, 28: 955–959.
- Fraser L y J. Strzezek. 2007. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci.*, 99: 317-329.
- Garner D., D. Pinkel, L. Johnson y M. Pace. 1987. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34: 127-138.
- Garner D. y L. Johnson. 1995. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction*, 53: 276-284.
- Geffen A. J. y O. Frayer. 1993. Retention of sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus* L.: the effects of time from activation, thermal shock and adenosine triphosphate levels. *Aquaculture and Fisheries Management*, 24: 203-209.
- Gwo J.C., K. Strawn, M. Longnecker y C. Arnold. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture*, 94: 355-375.
- Gwo J.C. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39: 1331-1342.
- Gwo H., T. Weng, L. Fan y Y. Lee. 2005. Development of cryopreservation procedures for semen of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Aquaculture*, 249: 205-211.
- Hajirezaee S., B. M. Amiri y A. Mirvaghefi. 2010. Fish milt quality and major factors influencing the milt quality parameters: A review. *African Journal of Biotechnology*, 9 (54): 9148-9154.
- He S.Y. y C. Woods. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, 48(3): 254-262.



- Hoang M., H. Kyu, B. Hwa, M. Seon, M. Hyun, J. Uie y Y. Jin. 2010. Effects of varying dilutions, pH, temperature and cations on spermatozoa motility in fish *Larimichthys polyactis*. J. Environ. Biol., 32: 271-276.
- Howell, B.R. 1997. A re-appraisal of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. Aquaculture, 155: 355-365.
- Jenkins, J.A. y S.L., Goodbred. 2005. Viability of Male Gametes in Common Carp *Cyprinus carpio* along the Lower Colorado River from the Cibola National Wildlife Refuge (NWR), Havasu NWR, and Lake Mohave of Lake Mead National Recreation Area: USGS Open-File Report 2006-1007, 25 p.
- Joo R. y E. Dupré. 2002. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermática de la macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia). Investigaciones Marinas, 30: 75-79.
- Kho K.H., Y.J. Chang y H.K. Lim. 1997. Effect of osmolality and  $Ca^{2+}$  on sperm motility in marbled sole, *Limanda yokohamae*. J. Korean. Fish. Soc., 30(5): 809-815.
- Kho K.H., M. Morisawa y K.S. Choi. 2005. Cell signaling mechanisms of sperm motility in aquatic species. Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(3): 665-671.
- Kime D.E., K.J.W. Van Look, B.G. McAllister, G. Huyskens, E. Rurangwa y F. Ollevier. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 130: 425-433.
- Klimowicz-Bodys M.D., F. Batkowskic, A.S. Ochremd y M.A. Savic. 2012. Comparison of assessment of pigeon sperm viability by contrast phase microscope (eosin-nigrosin staining) and flow cytometry (SYBR-14/ propidium iodide (PI) staining). Theriogenology, 77: 628–635.
- Kurland C. y S. Andersson. 2000. Origin and Evolution of the mitochondrial proteome. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64: 786-820.

- Lanes, C., M. Okamoto, A. Bianchini, L. Marins y L. Sampaio. 2010. Sperm quality of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* throughout the reproductive season. *Aquaculture Research*, 1-9.
- Lim H.K. y S.Y. Kim. 2007. Effect of exogenous hormones on spermiation in the starry flounder *Platichthys stellatus*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 40(6): 374-379.
- Lim H.K, C.M. An, G.A. Noh y B.H.Min. 2007. Effects of diluents and cryoprotectants on sperm cryopreservation in starry flounder (*Platichthys stellatus*). *J. Aquaculture*, 20(3): 173-177.
- Linhart O., Alavi S.M.H., Rodina M., Gela D. y Cosson J. 2008. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Applied Ichthyology*, 24: 386-396.
- Liu, X., S. Zhang, Y. Zhang y Y. Xu. 2006. Cryopreservation of the sperm of spotted halibut *Verasper variegates* (Pleuronectiformes, Pleuronectidae). *Indian J. Mar. Sci.*, 35: 24-28.
- Mañanós E., J.M. Guzmán, J. Ramos, C.C. Mylonas, J. Zohar, J.B. Peleteiro, O. Chereguini, N. Duncan, C. Sarasquete y A. Ríaza. 2008. Hormonal stimulation of ovulation, spermiation and spawning in cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock. In: *Report of the IV Workshop on the cultivation of Soles*. Faro, Portugal, 16-17.
- Martínez J. y S. Pardo. 2010. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta biol. Colomb.*, 15 (2): 3 – 24.
- Medina, V., Y. Velasco y P. Cruz. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18: 1.
- Munikittrick K.R. y R.D. Moccia. 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constitutions. *Aquaculture*, 64, 147-156.

- Mylonas C.C., M. Papadaki y P. Divanach. 2003. Seasonal changes in sperm production and quality in the red porgy *Pagrus pagrus* (L.). *Aquac. Res.*, 34(13): 1161-1170.
- Nynca J. y A.J. Ciereszko. 2009. Measurement of concentration and viability of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) spermatozoa using computer-aided fluorescent microscopy. *Aquaculture*, 292: 256–258.
- Ohtake H. 2003. Sperm-activating proteins obtained from the herring eggs. *Fish Physiology and Biochemistry* 28(1-4): 199-202.
- Olsen, Y., J.O. Evjemo y A. Olsen. 1999. Status of cultivation technology for production of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) juveniles in Norway/Europe. *Aquaculture*, 176 (1): 5-13.
- Ottesen O.H., I. Babiak y G. Dahle. 2009. Sperm competition and fertilization success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 286(3-4): 240-245.
- Paniagua C., J. Jenkins, M. Segovia y T. Tiersch. 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use fluorescent dyes. *Cryobiology*, 53: 128-138.
- Palumbo, A., J. Linares, W. Jewell, S. Doroshov y R. Tjeerdema. 2007. Induction and partial characterization of California halibut (*Paralichthys californicus*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 146: 200-207.
- Pequeño, G. 1989. Lista de peces de Chile. Revisada y comentada. *Rev. Biol. Mar.*, 24: 1-132.
- Piironen J. 1985. Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* m. *Sebago* Girard) during a spawning season. *Aquaculture*, 48: 337-350.
- Polge C., Smith A.U. y Parkes A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172): 666.

- Poupard, G., C. Paxion, J. Cosson, C. Jeulin, F. Fierville y R. Billard. 1998. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP reduction after milt contamination by urine. *Aquaculture*, 160: 317-328.
- Pullin R.V.S. 1972. The storage of plaice (*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperature. *Aquaculture*, 1: 279-83.
- Rana K. 1995. Cryopreservation of aquatic gametes and embryos: recent advances and applications. In: Goetz F.W., Thomas P. (edit.). *Reproductive physiology of fish*. Austin, TX: Proceedings of the Fifth International Symposium, p. 85-9.
- Richardson, G., C. Wilson, L. Crim y Z. Yao. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture*, 174: 89-94.
- Rideout, R.M., M.K, Litvak y E.A. Trippel. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquac. Res.*, 34: 653-659.
- Riley K., C. Holladay, E. Chesne y T. Tiersch. 2004. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). *Aquaculture*, 238: 183-194.
- Rouxel, C., M. Suquet, J. Cosson, A. Severe, L. Quemener y C. Fauvel. 2008. Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. *Aquaculture Research*, 39 (4): 434-440.
- Rurangwa E., D.E. Kime, F. Ollevier y J.P.Nash. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234: 1-28.
- Samamé M. y J. Castañeda. 1999. Biología y pesquería del lenguado *Paralichthys adspersus*, con especial referencia al área norte del litoral peruano, departamento de Lambayeque. *Bol. Inst. Mar Perú*, 18 (1-2): 15-48.
- Schiavone R., L. Zilli, S. Vilella y C. Fauvel. 2006. Human chorionic gonadotropin induces spermatogenesis and spermiation in 1-year-old European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Assessment of sperm quality. *Aquaculture*, 255(1-4): 522-531.

- Schulz R., L. de França, J. Lareyre, F. LeGac, H. Chiarini-Garcia, R. Nobrega y T. Miura. 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 390–411.
- Shao M.Y., Z.F. Zhang, L. Yu, J.J. Hu y K.H. Kang. 2006. Cryopreservation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) sperm. *Aquaculture Research*, 37: 1450-1457.
- Siefeld, W., M. Vargas y I. Kong. 2003. Primer registro de *Etropus ectenes* (Jordan, 1889), *Bothus constellatus* (Jordan & Goss, 1889), *Achirus klunzingeri* (Steindachner, 1880) y *Symphurus elongates* (Gunther, 1868) (Piscis, Pleuronectiformes) en Chile, con comentarios sobre la distribución de los lenguados chilenos. *Invest. Mar. Valparaíso*, 31: 51- 65.
- Silva, A. 2001. Advances in the culture research of small-eye flounder, *Paralichthys microps*, and Chilean flounder, *P. adspersus*, in Chile. *J. Appl. Aquacult.*, 11:147-164.
- Silva A. y M. Oliva. 2010. Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(3): 377-386.
- Spallanzani L. 1776. Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell'uomo e degli animali. In *Opusculi di Fisica Animale e Vegetabile*, Opusculo II. Modena, Italy.
- Storey, K. 1990. Life in a frozen state: adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles. *American Physiological Society*, 258: 559–568.
- Suquet M., 1992. La production de sperme chez le turbot (*Scophthalmus maximus*): Aspects descriptifs et expérimentaux. Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études, Paris, p. 96.
- Suquet, M., R. Billard, J. Cosson, G. Dorange, L. Chauvaud, C. Mugnier y C. Fauvel. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquat. Living Resour.*, 7:283-294.

- Suquet M., C. Dreanno, G. Dorange, Y. Normant, L. Quemener, J.L. Gaignon y R. Billard 1998. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *J. Fish. Biol.*, 52:31-41.
- Suquet, M., C. Dreanno, C. Fauvel, J. Cosson y R. Billard. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31: 231–243.
- Suquet, M., J. Cosson, F. De La Gándara, C.C. Mylonas, M. Papadaki, S. Lallemant y C. Fauvel. 2010. Sperm features of captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 775–778.
- Tian Y.S., S.L. Chen, X.S. Ji, J.M. Zhai, L.J. Sun, C. Chen y P.Z. Su. 2008. Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. *Aquaculture*, 284: 268–271.
- Tiersch, T.R. y M. Mazik. 2000. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. En: Tiersch, T.R. y M. Mazik (edit.). *Cryopreservation in Aquatic Species*. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana: 439 pp.
- Tiersch T.R., H. Yang, J.A. Jenkins y Q. Dong. 2007. Sperm cryopreservation in fish and shellfish. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 65: 493-508.
- Tvedt, H.B., T.J. Benfey, D.J. Martin-Robichaud y J. Power. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, 194: 191–200.
- Valdebenito I. 2008. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. *Arch. Med. Vet.*, 40: 115-123.
- Vermeirssen, E.L.M., R. Shields, C. Mazorra de Quero y A.P. Scott, 2000. Gonadotrophin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 22: 77–87.

- Vuthiphandchai V., S. Chomphuthawach y S. Nimrat. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology*, 72(1):129-38.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 481-492.
- Woods E., J. Benson, Y. Agca y J. Critser. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48(2): 146–156.
- Yamaguchi, T., S. Yamaguchi, T. Hirai y T. Kitano. 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and *Foxl2* are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359: 935-940.
- Yao Z., L.W. Crim, G.F. Richardson y C.J. Emerson. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, 181(3-4): 361-375.
- Young J.A., M.F. Capra y A.W. Blackshaw. 1992. Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliata*) spermatozoa. *Aquaculture*, 102: 155-160.
- Zhang, Y.-Z., S.-C. Zhang, X.-Z. Liu, Y.-Y. Xu, C.-L. Wang, M.-S. Sawant, J. Li y S.-L. Chen. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60: 989–996.
- Zohar, Y. y C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in culture fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197:99-136.

## ANEXO 1

### Identificación de individuos por código electrónico.

Código de Identificador Electrónico	Individuo
884795	1
905347	2
920736	3
923083	4
925872	5
927109	6
927798	7
930226	8
938392	9
939717	10
1095208	11